

Philipps



Universität  
Marburg

# Regulation der zellulären Adhäsion von *Saccharomyces cerevisiae* durch pH und den Rim101-Signalweg

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

R a p h a e l B i r k e

aus Volkmarsen

Marburg/Lahn 2011

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation  
am 13.05.2011 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch

Zweitgutachter: Prof. Dr. Michael Bölker

Tag der mündlichen Prüfung am 16.06.2011

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch von Januar 2006 bis Juni 2010 an der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

Weitere wissenschaftliche Beiträge:

Froquet R, Cherix N, Birke R, Benghezal M, Cameroni E, Letourneur F, Mösch H-U, De Virgilio C, Cosson P (2008) Control of Cellular Physiology by TM9 Proteins in Yeast and Dictyostelium. *J Biol Chem* **283**(11): 6764-6772.

Birke R, Schäfer M, Mösch H-U (2011) Regulation of *FLO11*-dependent adhesion by pH involves Rim101-dependent and -independent mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. (in preparation)

Brückner S, Kern S, Birke R, Mösch H-U (2011) The TEA transcription factor Tec1 links MAPK and TOR pathways to coordinate yeast development. (submitted)

## Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Regulation der zellulären Adhäsion von *Saccharomyces cerevisiae* durch pH und den Rim101-Signalweg“ selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

---

Marburg/Lahn, 18. März 2011  
(Ort, Datum)

---

*im Original gezeichnet*  
(Raphael Birke)

*Gewidmet meinen Eltern*

*Der Zweifel ist der Beginn der Wissenschaft. Wer nichts anzweifelt, prüft nichts.  
Wer nichts prüft, entdeckt nichts. Wer nichts entdeckt, ist blind und bleibt blind.*

Marie-Joseph Pierre Teilhard de Chardin (1881-1955)

*französischer Jesuit, Theologe, Philosoph, Anthropologe, Geologe und Paläontologe*

## Zusammenfassung

Die Steuerung der zellulären Adhäsion nimmt in vielen Mikroorganismen eine bedeutende Rolle bei der Kontaktaufnahme mit verschiedensten Umweltstandorten ein. Auch die Sprosshefe *Saccharomyces cerevisiae* ist in der Lage, ihre adhäsiven Eigenschaften an die Umweltbedingungen anzupassen. Hierzu verfügt *S. cerevisiae* über mehrere Zelloberflächen-Glycoproteine, die Flokkuline, die zur Familie der pilzlichen GPI-verankerten Adhäsine gehören. Ein zentrales Flokkulin ist Flo11, das Adhäsion an Agar- und Plastikoberflächen ermöglicht. Die Expression des *FLO11*-Gens wird über einen ungewöhnlich großen Promotor durch zahlreiche Signalwege als Antwort auf verschiedene Umweltstimuli komplex reguliert.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation der Flo11-vermittelten Adhäsion durch den äußeren pH im Detail untersucht. Im Zentrum stand dabei die Rolle des Rim101-Signalwegs, der bei Pilzen stark konserviert ist und für die pH-abhängige Regulation verschiedener zellulärer Prozesse verantwortlich ist. Es konnte gezeigt werden, dass der Rim101-Signalweg in *S. cerevisiae* für die Flo11-abhängige Adhäsion in saurem und neutralem Milieu wichtig ist. Dabei reguliert der transkriptionelle Repressor Rim101 die *FLO11*-Expression indirekt über die Steuerung der Gene für die Transkriptionsrepressoren Nrg1, Nrg2 und Smp1. Hierfür konnten mehrere DNA-Elemente im *FLO11*-Promotor identifiziert werden, die durch Nrg1 und Nrg2 *in vitro* gebunden und *in vivo* reguliert werden. Weiterführende genomweite Transkriptomanalysen ergaben, dass *FLO11* zu einer großen Gruppe von Genen gehört, die beim Übergang von neutralem zu alkalischem pH stark reguliert werden. Es zeigte sich, dass die *FLO11*-Expression und die Flo11-abhängige Adhäsion in alkalischem Milieu stark unterdrückt werden. Dabei erfolgt die Reduktion der *FLO11*-Expression unabhängig vom Rim101-Signalweg und wird über ein unbekanntes Regulationssystem vermittelt. Zusätzlich deuten zellbiologische Analysen darauf hin, dass eine Veränderung der Zelloberfläche, möglicherweise hervorgerufen durch eine direkte Inaktivierung von Flo11, Ursache für den ausgeprägten Adhäsionsverlust unter alkalischen pH-Bedingungen ist.

## Summary

In many microorganisms the control of cellular adhesion plays a crucial role in establishing contact to various environmental habitats. This also includes the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* that is capable of adapting its adhesive properties to changes in the environment. *S. cerevisiae* possesses a set of cell surface glycoproteins – the flocculins – which belong to the family of fungal GPI-linked adhesins. A key flocculin for adhesion to agar and plastic surfaces is Flo11. *FLO11* gene expression underlies the complex control of numerous signaling pathways that converge on the exceptionally large *FLO11* promoter and respond to diverse environmental stimuli.

In this work, the regulation of the Flo11-dependent adhesion by external pH was investigated in detail. One focus was on the Rim101 signaling pathway, which is highly conserved in fungi and confers pH-dependent regulation of diverse cellular processes. The results obtained demonstrate that the Rim101 signaling pathway of *S. cerevisiae* plays a central role in controlling Flo11-dependent adhesion under acidic and neutral conditions. It was found that the transcriptional repressor Rim101 indirectly regulates *FLO11* expression by controlling expression of the genes for the transcriptional repressors Nrg1, Nrg2 and Smp1, hereby. Several DNA elements within the *FLO11* promoter could be identified and characterized that confer *in vitro* binding and *in vivo* regulation by Nrg1 and Nrg2. Genome-wide transcriptional analysis revealed that *FLO11* belongs to a large group of genes that are strongly regulated during the shift from neutral to alkaline pH. It was found that *FLO11* expression and Flo11-dependent adhesion are strongly down-regulated under alkaline conditions. The reduction of *FLO11* expression occurs independent of the Rim101 signaling pathway by a yet unknown regulatory system. Finally cell biological measurements suggest that an alteration of cell surface peptides – possibly induced by inactivation of the Flo11-protein may be an additional cause for the distinctive loss of adhesion under alkaline conditions.

## Abkürzungen und Fachbegriffe

|                         |  |
|-------------------------|--|
| °C .....                | Grad Celsius                           |
| Abb. ....               | Abbildung                              |
| Ac.....                 | Acetat                                 |
| AMP .....               | Adenosinmonophosphat                   |
| Amp .....               | Ampicillin                             |
| APS .....               | Ammoniumpersulfat                      |
| ATP.....                | Adenosintriphosphat                    |
| BLAST.....              | „Basic Local Alignment Search Tool“    |
| BM .....                | Bindemotiv                             |
| bp .....                | Basenpaare                             |
| BS .....                | Bindesequenz                           |
| BSA .....               | Bovines Serumalbumin                   |
| cAMP .....              | Cyclo-Adenosinmonophosphat             |
| cDNA.....               | komplementäre DNA                      |
| ChIP .....              | Chromatin-Immunopräzipitation          |
| cRNA .....              | komplementäre RNA                      |
| CTD .....               | C-terminale Domäne                     |
| C-terminal .....        | Carboxy-terminal                       |
| Da.....                 | Maßeinheit „Dalton“                    |
| dH <sub>2</sub> O ..... | destilliertes Wasser                   |
| DMSO.....               | Dimethylsulfoxid                       |
| DNA.....                | Desoxyribonukleinsäure                 |
| DNase .....             | Desoxyribonuklease                     |
| dNTP.....               | Desoxy-Nukleosid-5'-triphosphat        |
| DTT .....               | Dithiothreitol                         |
| ECL.....                | „Enhanced Chemiluminescence“           |
| EDTA.....               | Ethylendiamintetraacetat               |
| EMSA .....              | „Electrophoretic Mobility Shift Assay“ |
| ER .....                | Endoplasmatisches Retikulum            |
| <i>et al.</i> .....     | „und andere“                           |
| EtOH.....               | Ethanol                                |



|                  |  |
|------------------|--|
| EW .....         | Expressionswert  |
| FACS .....       | „Fluorescence Activated Cell Sorting“                    |
| g .....          | Erdbeschleunigung  |
| GFP .....        | grün-fluoreszierendes Protein                            |
| GO .....         | Gen Ontologie  |
| GPI .....        | Glykosyl-Phosphatidyl-Anker                              |
| GST .....        | Glutathion-S-Transferase                                 |
| GTP .....        | Guanosintriphosphat                                      |
| HCl .....        | Hydrochlorid   |
| HEPES .....      | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure    |
| IgG .....        | Immunglobulin G  |
| kb .....         | Kilobasenpaare   |
| KOH .....        | Kaliumhydroxid   |
| LB .....         | „Lysogeny Broth“ komplexes Nährmedium für <i>E. coli</i> |
| m .....          | milli  |
| M .....          | molar  |
| MCS .....        | „Multiple Cloning Site“                                  |
| min .....        | Minute   |
| mRNA .....       | „messenger RNA“  |
| MVB .....        | „Multivesicular Bodies“                                  |
| n .....          | nano   |
| NMF .....        | nicht-negative Matrix-Faktorisierung                     |
| NSS .....        | nukleäre Lokalisations-Sequenz                           |
| N-terminal ..... | Amino-terminal   |
| Ø .....          | Durchmesser  |
| OD .....         | Optische Dichte  |
| o-NPG .....      | o-Nitrophenol-galaktosid                                 |
| ORF .....        | offenes Leseraster                                       |
| PAGE .....       | Polyacrylamid-Gelelektrophorese                          |
| PBS .....        | Phosphat gepufferte Kochsalzlösung                       |
| PCR .....        | Polymerase-Kettenreaktion                                |
| PEG .....        | Polyethylenglykol  |
| pH .....         | „potentia Hydrogenii“                                    |

|                  |   |
|------------------|---|
| PMSF .....       | Phenylmethylsulfonylfluorid                                     |
| PWM.....         | „Position Weight Matrix“  |
| RFP .....        | rot fluoreszierendes Protein                                    |
| RNA.....         | Ribonukleinsäure  |
| RNase.....       | Ribonuklease  |
| SC .....         | „Synthetic Complete“ synth. Nährmedium für <i>S. cerevisiae</i> |
| SDS.....         | Natriumdodecylsulfat  |
| SEM .....        | Scan-Elektronenmikroskopie                                      |
| SF.....          | Standardfehler  |
| Tab. ....        | Tabelle   |
| TAE .....        | Tris/Acetat/EDTA  |
| TCA-Zyklus ..... | Citratzyklus  |
| TE .....         | Tris-EDTA (-Puffer)   |
| Tel.....         | Telomerregion   |
| TEMED .....      | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin                              |
| TF.....          | Transkriptionsfaktor  |
| TFB .....        | Transkriptionsfaktor-Bindestelle                                |
| Tris.....        | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan                                |
| t-RNA .....      | transfer-RNA  |
| Tween .....      | Polyoxyethylenesorbitanmonolaurate                              |
| UAS .....        | „Upstream Activating Sequence“                                  |
| UpM.....         | Umdrehungen pro Minute  |
| URS .....        | „Upstream Repressing Sequence“                                  |
| UV .....         | Ultraviolettstrahlung   |
| v/v .....        | „Volume per volume“   |
| w/v .....        | „Weight per volume“   |
| WT.....          | Wildtyp   |
| YNB.....         | „Yeast Nitrogen Base“   |
| YP .....         | „Yeast extract + Peptone“                                       |
| YPD .....        | „Yeast extract + Peptone + Dextrose“                            |
| YPG .....        | „Yeast extract + Peptone + Galactose“                           |
| $\lambda$ .....  | Wellenlänge   |
| $\mu$ .....      | micro   |

## Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 1: Differenzierungsmöglichkeiten von <i>S. cerevisiae</i> .....  | 1  |
| Abbildung 2: Trennung der Biomasse vom Fermentationsprodukt - obergärige Bierhefe .....  | 4  |
| Abbildung 3: Die Domänenstruktur der Adhäsine .....  | 6  |
| Abbildung 4: Cladogram der phylogenetischen Beziehungen der Adhäsine aus <i>S. cerevisiae</i> , <i>C. albicans</i><br>und <i>C. glabrata</i> ..... | 8  |
| Abbildung 5: Verschiedene Phänotypen, die durch Flo11 induziert werden .....   | 10 |
| Abbildung 6: Chromosomale Lokalisation der <i>FLO</i> -Gene in <i>S. cerevisiae</i> .....  | 12 |
| Abbildung 7: Signalwege der <i>FLO11</i> -Expression .....   | 16 |
| Abbildung 8: Der Rim101-Signalweg – Regulation unter alkalischem pH .....  | 23 |
| Abbildung 9: Modell der zweistufigen PacC-Prozessierung in <i>A. nidulans</i> .....  | 26 |
| Abbildung 10: Domänenstruktur und Alignment der Transkriptionsrepressoren Nrg1 und Nrg2 bzw.<br>Smp1 aus <i>S. cerevisiae</i> .....                | 30 |
| Abbildung 11: <i>RIM101</i> -abhängige Regulation des Flokkulins <i>FLO11</i> .....  | 34 |
| Abbildung 12: In saurem Milieu wird die Rim101-abhängige Adhäsion über den <i>FLO11</i> -Promotor<br>reguliert. ....                               | 34 |
| Abbildung 13: Die Transkriptionsrepressoren Nrg1, Nrg2 und Smp1 werden <i>RIM101</i> -abhängig reguliert.<br>.....                                 | 36 |
| Abbildung 14 A und B: Regulation des adhäsiven Wachstums durch Komponenten des Rim101 -<br>Signalwegs .....  | 37 |
| Abbildung 15: Quantitative Bestimmung der Adhäsion an Polystyrol von Hefestämmen, die verschiedene<br>Rim101-Signalwegskomponenten tragen.....     | 39 |
| Abbildung 16: Regulation der <i>FLO11</i> -Expression durch verschiedene Rim101-Signalwegskomponenten<br>.....                                     | 40 |
| Abbildung 17: Modell der Rim101-abhängigen <i>FLO11</i> -Regulation durch die Transkriptionsrepressoren<br>Nrg1, Nrg2 und Smp1 .....               | 41 |
| Abbildung 18: Bekannte Nrg1-Bindemotive .....  | 43 |
| Abbildung 19: <i>FLO11</i> -Promotorsequenz mit potentiellen Nrg1-Bindemotiven.....  | 44 |
| Abbildung 20: Bekannte Smp1-Bindemotive .....  | 45 |
| Abbildung 21: Bindeaffinitäten von Nrg1 und Nrg2 an <i>FLO11</i> -Bindesequenzen.....  | 46 |
| Abbildung 22: Klonierung von <i>FLO11</i> -Promotorfragmenten in das URS-Reporterplasmid pLG312n und<br>das UAS-Reporterplasmid pLG669ZA.....      | 48 |
| Abbildung 23: <i>FLO11</i> -Promotorsequenz mit getesteten Nrg1-Bindemotiven .....   | 50 |
| Abbildung 24: <i>lacZ</i> -Reporter-gen-Versuch mit Fragmenten des <i>FLO11</i> -Promotors in einem URS-<br>Reporterplasmid .....                  | 51 |
| Abbildung 25: <i>lacZ</i> -Reporter-gen-Versuch mit Fragmenten des <i>FLO11</i> -Promotors in einem UAS-<br>Reporterplasmid .....                  | 54 |
| Abbildung 26: Klonierung von <i>FLO11</i> -Promotorfragmenten in das URS-Reporterplasmid pLG312n ....  | 55 |

|  |     |
|--|-----|
| Abbildung 27: <i>lacZ</i> -Reporter-gen-Versuch mit Fragmenten des <i>FLO11</i> -Promotors in dem URS-Reporterplasmid pLG312n .....  | 56  |
| Abbildung 28: Schematische Darstellung der relativen Aktivität verschiedener <i>FLO11</i> -Promotorbereiche im URS-Reporterplasmid pLG312n in Deletionsstämmen des Rim101-Signalwegs ..... | 58  |
| Abbildung 29: In saurem Milieu wird Nrg1- und Nrg2-abhängige <i>FLO11</i> -Repression nicht allein über das Bindemotiv GGACCCT reguliert. ....   | 59  |
| Abbildung 30: Regulation des adhäsiven Wachstums durch Rim101 und andere Regulatoren von <i>FLO11</i> .....  | 61  |
| Abbildung 31 A und B: Effekt von pH auf die <i>FLO11</i> -abhängige Adhäsion.....  | 65  |
| Abbildung 32: Schematische Darstellung der Synthese der cRNA-Hybridisierungssonden .....   | 67  |
| Abbildung 33: Globale Microarrayanalyse durch Nicht-negative Matrix-Faktorisierung .....   | 69  |
| Abbildung 34: Vergleichende Transkriptomanalyse WT pH 4,5, pH 7, pH 8 & <i>rim101Δ</i> pH 7 und pH 8   | 71  |
| Abbildung 35: Funktionelle Kategorisierung von <i>S. cerevisiae</i> -Genen.....  | 73  |
| Abbildung 36: Hierarchisches Clustering von Transkriptionsfaktorgenen mit angereicherten TFBs .....  | 77  |
| Abbildung 37: Vergleichende Transkriptomanalyse WT pH 7 - <i>rim101Δ</i> pH 7 und WT pH 8 - <i>rim101Δ</i> pH 8.....   | 79  |
| Abbildung 38: Hierarchisches Clustering von Komponenten des Rim101-Signalwegs und <i>FLO11</i> .....   | 81  |
| Abbildung 39: Der Transkriptionsrepressor Rim101 wird pH-abhängig reguliert. ....  | 82  |
| Abbildung 40: Die Transkriptionsrepressoren Nrg1, Nrg2 und Smp1 werden Rim101- und pH-abhängig reguliert. ....   | 84  |
| Abbildung 41: Quantitative Bestimmung der pH-abhängigen Adhäsion an Polystyrol unter verschiedenen pH-Bedingungen und Einfluss von Rim101-Signalwegskomponenten .....                      | 85  |
| Abbildung 42: FACS-Analyse des in Abhängigkeit von pH an der Zelloberfläche exponierten 3HA-Flo11 .....  | 87  |
| Abbildung 43: Die <i>FLO11</i> -Transkriptmenge nimmt unter alkalischem pH ab. ....  | 88  |
| Abbildung 44: Unter alkalischen pH-Bedingungen kann der Adhäsionsverlust nicht kompensiert werden. ....  | 88  |
| Abbildung 45: Ein unter neutralen Bedingungen ausgebildeter adhäsiver Kontakt ist in alkalischem Milieu stabil. ....   | 91  |
| Abbildung 46: Hefezellen sedimentieren unter pH 8-Bedingungen Flo11-unabhängig. ....   | 92  |
| Abbildung 47: Zelloberflächenveränderung unter alkalischem pH .....  | 93  |
| Abbildung 48: Modell der Rim101-abhängig regulierten <i>FLO11</i> -Expression unter aziden Wachstumsbedingungen.....   | 100 |
| Abbildung 49: Modell der kooperativen Regulation von <i>FLO11</i> durch Nrg1 und Nrg2.....   | 102 |
| Abbildung 50: Die pH-abhängige Regulation des adhäsiven Wachstums erfolgt sowohl in Abhängigkeit als auch unabhängig vom Rim101-Signalweg. ....  | 114 |

## Inhaltsverzeichnis

|   |      |
|---|------|
| Zusammenfassung .....   | I    |
| Summary.....  | II   |
| Abkürzungen und Fachbegriffe .....  | III  |
| Abbildungsverzeichnis.....  | VI   |
| Inhaltsverzeichnis .....  | VIII |
| 1    Einleitung.....  | 1    |
| 1.1    Der Lebenszyklus von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....                           | 1    |
| 1.2    Bedeutung der Adhäsion in Hefepilzen .....   | 4    |
| 1.3    Aufbau und Sekretion der Adhäsine in Hefepilzen.....                                 | 6    |
| 1.4    Adhäsinfamilien .....  | 8    |
| 1.4.1    Adhäsine aus <i>S. cerevisiae</i> .....  | 9    |
| 1.4.2    Adhäsine aus opportunistisch pathogenen Hefepilzen .....                           | 13   |
| 1.5    Das Flokkulin <i>FLO11</i> – Regulation und beteiligte Signalwege .....              | 16   |
| 1.5.1    Snf1-/Glucose-Repressions-Signalweg .....  | 17   |
| 1.5.2    Ras2-/cAMP-Signalweg .....   | 18   |
| 1.5.3    MAPK-Signalkaskade des filamentösen Wachstums.....                                 | 19   |
| 1.5.4    Generelle-Aminosäure-Kontrolle-Signalweg .....                                     | 20   |
| 1.5.5    Weitere <i>FLO11</i> -Regulatoren und regulatorische Systeme .....                 | 20   |
| 1.6    Einfluss von pH auf Rim101-regulierte Prozesse in <i>S. cerevisiae</i> .....         | 22   |
| 1.7    pH-Regulation in Pilzen durch Homologe von Rim101 .....                              | 25   |
| 1.8    Die Transkriptionsfaktoren Nrg1, Nrg2 und Smp1.....                                  | 29   |
| 1.9    Ziele dieser Arbeit.....   | 32   |
| 2    Ergebnisse.....  | 33   |
| 2.1    Kontrolle der <i>FLO11</i> -abhängigen Adhäsion durch den Rim101-Signalweg... 33     |      |
| 2.1.1    Einfluss von <i>RIM101</i> auf die <i>FLO11</i> -Expression und die Adhäsion ..... | 33   |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 2.1.2 | <i>RIM101</i> reguliert <i>FLO11</i> abhängig von <i>NRG1</i> , <i>NRG2</i> und <i>SMP1</i> .....                        | 35 |
| 2.2   | Feinanalyse der Regulation des <i>FLO11</i> -Promotors durch die Transkriptionsfaktoren Nrg1, Nrg2 und Smp1 .....        | 42 |
| 2.2.1 | Bioinformatische Analyse des <i>FLO11</i> -Promotors auf mögliche Nrg1-, Nrg2- und Smp1-Bindestellen .....               | 43 |
| 2.2.2 | Bestimmung des Bindeverhaltens von Nrg1 und Nrg2 an DNA-Fragmente des <i>FLO11</i> -Promotors mittels EMSA.....          | 45 |
| 2.2.3 | <i>In vivo</i> -Funktion potentieller Nrg1-Bindemotive im <i>FLO11</i> -Promotor ...                                     | 47 |
| 2.2.4 | Analyse von <i>FLO11</i> -Promotorfragmenten auf Nrg1-abhängige URS-Elemente .....                                       | 50 |
| 2.2.5 | Analyse von <i>FLO11</i> -Promotorfragmenten auf Nrg1-kontrollierte UAS-Elemente .....                                   | 53 |
| 2.2.6 | Analyse des <i>FLO11</i> -Promotors auf URS-Elemente in Deletionsstämmen des Rim101-Signalwegs .....                     | 55 |
| 2.2.7 | Die Nrg1- und Nrg2-abhängige <i>FLO11</i> -Repression wird nicht allein über das Bindemotiv GGACCCT reguliert.....       | 59 |
| 2.3   | Verbindung zwischen Rim101 und anderen Regulatoren von <i>FLO11</i> .....  | 60 |
| 2.4   | Regulation der <i>FLO11</i> -abhängigen Adhäsion durch pH .....  | 63 |
| 2.4.1 | Effekt von pH auf die Adhäsion .....   | 64 |
| 2.5   | Globale pH-Antwort in adhäsiven Hefestämmen in saurem, neutralem und alkalischem Milieu .....                            | 66 |
| 2.5.1 | Globales NMF-Konsensus-Clustering.....   | 68 |
| 2.5.2 | Globale Transkriptomanalyse .....  | 70 |
| 2.5.3 | Analyse auf Anreicherung bestimmter Transkriptionsfaktorbindestellen   | 75 |
| 2.6   | <i>RIM101</i> -abhängige Zielgenregulation durch pH .....  | 78 |
| 2.6.1 | Transkriptomanalyse <i>RIM101</i> -abhängig exprimierter Gene unter neutralen und alkalischen Umgebungsbedingungen ..... | 78 |
| 2.6.2 | Regulation von Komponenten des Rim101-Signalwegs durch pH .....  | 80 |
| 2.6.3 | Einfluss des Rim101-Signalwegs auf die pH-abhängige Adhäsion .....   | 85 |

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 2.6.4 | Einfluss von pH auf die Flo11-vermittelte Adhäsion .....   | 86  |
| 2.7   | pH-abhängige Ausbildung adhäsiver Strukturen/Biofilme .....  | 89  |
| 2.7.1 | Ein unter neutralen Bedingungen ausgebildeter adhäsiver Kontakt ist in alkalischem Milieu stabil .....                     | 90  |
| 2.7.2 | pH 8-abhängige Sedimentation erfolgt Flo11-unabhängig .....  | 91  |
| 2.7.3 | Veränderung der Zelloberfläche durch alkalischen pH .....  | 92  |
| 3     | Diskussion.....  | 94  |
| 3.1   | Regulation des adhäsiven Wachstums durch den Rim101-Signalweg unter vegetativen Wachstumsbedingungen .....                 | 94  |
| 3.1.1 | Die Transkriptionsrepressoren Nrg1, Nrg2 und Smp1 regulieren das Flo11-abhängige Wachstum in Abhängigkeit von Rim101 ..... | 94  |
| 3.1.2 | Die Rolle weiterer Faktoren bei der <i>RIM101</i> -abhängig regulierten Adhäsion .....                                     | 96  |
| 3.1.3 | Modell der Rim101-abhängig regulierten <i>FLO11</i> -Expression unter aziden Bedingungen .....                             | 99  |
| 3.2   | Regulation und Steuerung des <i>FLO11</i> -Promotors durch Nrg1 und Nrg2.....  | 101 |
| 3.3   | Globale Veränderungen der Genexpression durch alkalischen pH.....  | 106 |
| 3.4   | Regulation des Rim101-Signalwegs und der <i>FLO11</i> -Expression durch pH .   | 113 |
| 3.5   | Einfluss von alkalischem pH auf die Flo11-abhängige Hefezelladhäsion.....  | 116 |
| 4     | Material.....  | 119 |
| 4.1   | Chemikalien .....  | 119 |
| 4.1.1 | Bezugsquellen von Chemikalien, Enzymen und Kits.....   | 119 |
| 4.1.2 | Puffer und Lösungen.....   | 122 |
| 4.1.3 | Antibiotika .....  | 125 |
| 4.1.4 | Nährmedien.....  | 126 |
| 4.1.5 | Antikörper .....   | 127 |
| 4.1.6 | Polyacrylamid-Gele .....   | 128 |
| 4.2   | Stämme, Plasmide und Oligonukleotide .....   | 128 |

|        |   |     |
|--------|---|-----|
| 4.2.1  | <i>S. cerevisiae</i> -Stämme .....  | 128 |
| 4.2.2  | Plasmide .....  | 134 |
| 4.2.3  | Oligonukleotide .....   | 140 |
| 5      | Methoden .....  | 146 |
| 5.1    | Kultivierung der Mikroorganismen.....   | 146 |
| 5.1.1  | Kultivierung von <i>E. coli</i> .....   | 146 |
| 5.1.2  | Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> .....   | 146 |
| 5.2    | Isolierung und Manipulation von DNA .....   | 147 |
| 5.2.1  | Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> mit Hilfe eines „Mini-Präp-Kits“<br>.....               | 147 |
| 5.2.2  | Minipräparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> (Birnboim & Doly, 1979)..<br>.....                 | 148 |
| 5.2.3  | Isolierung von Gesamt-DNA aus <i>S. cerevisiae</i> : „Smash & Grab“<br>(Hoffman & Winston, 1987)..... | 148 |
| 5.2.4  | Polymerase-Kettenreaktion „PCR“ (modifiziert nach Saiki <i>et al.</i> , 1985) ....<br>.....           | 149 |
| 5.2.5  | Sequenzspezifische Mutagenese (Quick-Change Mutagenese) .....   | 150 |
| 5.2.6  | Restriktion von DNA .....   | 150 |
| 5.2.7  | Zusammenlagerung einzelsträngiger DNA-Fragmente .....   | 151 |
| 5.2.8  | Dephosphorylierung und Ligation von DNA .....   | 151 |
| 5.2.9  | Phosphorylierung von DNA-Fragmenten .....   | 151 |
| 5.2.10 | Ligation von DNA (modifiziert nach Maniatis <i>et al.</i> , 1982 ) .....                              | 152 |
| 5.2.11 | <i>S. cerevisiae</i> <i>in vivo</i> -Ligation (modifiziert nach Jansen <i>et al.</i> , 2005) .....    | 152 |
| 5.2.12 | Mikrodialyse von DNA-Lösungen (Marusyk & Sergeant, 1980) .....  | 153 |
| 5.2.13 | Agarose-Gelelektrophorese .....   | 153 |
| 5.2.14 | Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....  | 153 |
| 5.2.15 | Herstellung von DNA-Sonden für die Southern- und Northern-<br>Hybridisierung .....                    | 154 |



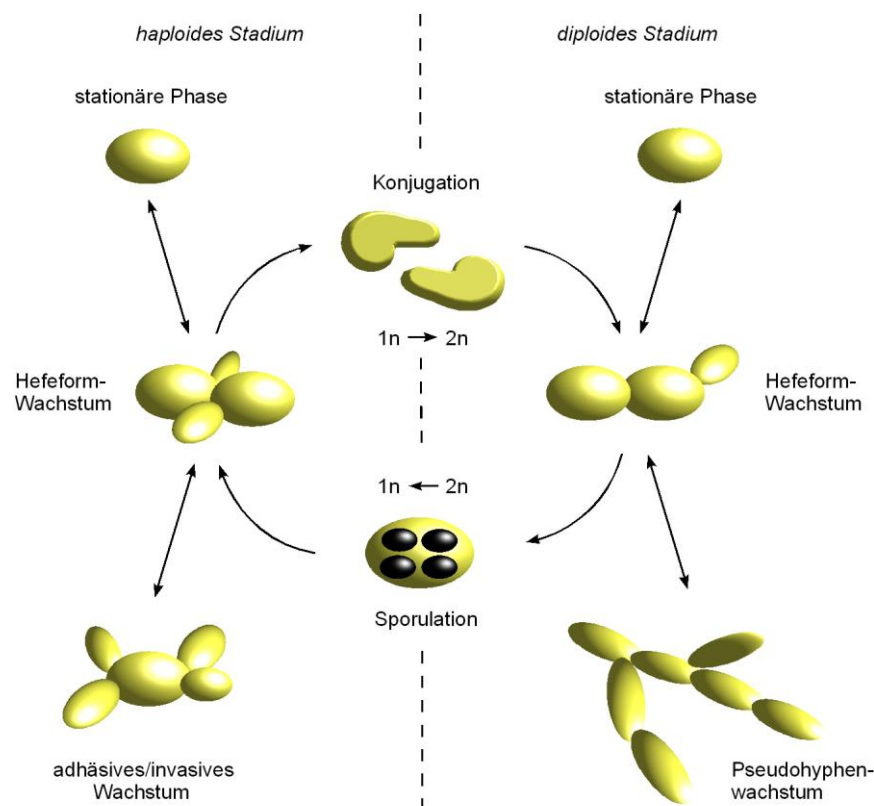
|         |  |     |
|---------|--|-----|
| 5.3     | Transformationsmethoden.....   | 154 |
| 5.3.1   | Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> „SOC-Methode“<br>(modifiziert nach Mandel & Higa, 1970) .....                                 | 154 |
| 5.3.2   | Transformation elektrokompenter <i>E. coli</i> (modifiziert nach Dower <i>et al.</i> ,<br>1988) .....  | 155 |
| 5.3.3   | Transformation von <i>S. cerevisiae</i> (modifiziert nach Knop <i>et al.</i> , 1999) .....   | 156 |
| 5.3.4   | Generierung von Gendelektionen (Güldener <i>et al.</i> , 1996).....  | 157 |
| 5.4     | Analyse von DNA .....  | 157 |
| 5.4.1   | Nachweis von DNA „Southern-Analyse“ (Southern, 1975) .....   | 157 |
| 5.4.1.1 | Gelelektrophoretische Auftrennung der DNA.....   | 157 |
| 5.4.1.2 | Immunochemische Detektion von DNA .....  | 158 |
| 5.4.2   | Sequenzierung von DNA .....  | 159 |
| 5.5     | Analyse von RNA .....  | 159 |
| 5.5.1   | Nachweis von RNA „Northern-Analyse“ .....  | 159 |
| 5.5.1.1 | Präparation von RNA (Cross & Tinkelenberg, 1991) .....   | 159 |
| 5.5.1.2 | Denaturierende RNA-Gelelektrophorese (modifiziert nach McMaster<br>& Carmichael, 1977) .....   | 160 |
| 5.5.1.3 | Immunochemische Detektion von RNA .....  | 160 |
| 5.5.2   | Transkriptom-Analyse .....   | 161 |
| 5.5.2.1 | Wachstumsbedingungen.....  | 161 |
| 5.5.2.2 | RNA-Isolierung .....   | 162 |
| 5.5.2.3 | Probenaufbereitung nach dem „GeneChip® Expression Analysis<br>Technical Manual“ (AFFYMETRIX GmbH) .....  | 162 |
| 5.5.2.4 | NMF-Konsensus-Clustering.....  | 167 |
| 5.6     | Protein-Methoden.....  | 168 |
| 5.6.1   | Herstellung von Proteinextrakten aus <i>S. cerevisiae</i> für die<br>immunochemische Detektion (modifiziert nach Riezman <i>et al.</i> , 1983) . | 168 |

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 5.6.2 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese: „SDS-PAGE“ (modifiziert nach Laemmli, 1970).....  | 169 |
| 5.6.3 | Immunochemische Detektion von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen „Western-Analyse“ (Towbin <i>et al.</i> , 1979).....                   | 169 |
| 5.6.4 | Herstellung von Proteinextrakten aus <i>S. cerevisiae</i> für den photometrischen $\beta$ -Galaktosidase-Test (Rose & Botstein, 1983)..... | 171 |
| 5.6.5 | Photometrischer $\beta$ -Galaktosidase-Test (Rose & Botstein, 1983) .....  | 171 |
| 5.6.6 | Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford, 1976) .....   | 172 |
| 5.7   | Untersuchung von <i>S. cerevisiae</i> .....  | 173 |
| 5.7.1 | Waschtest zur Bestimmung des haploid adhäsiven Wachstums auf Agar (Roberts & Fink, 1994).....  | 173 |
| 5.7.2 | Waschtest zur Bestimmung des haploid adhäsiven Wachstums auf Polystyrol (Reynolds & Fink, 2001).....                                       | 173 |
| 5.7.3 | Sedimentationstest zur Bestimmung der Zell-Verklumpung.....  | 174 |
| 5.7.4 | FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting).....  | 174 |
| 5.7.5 | Scan-Elektronenmikroskopie.....  | 176 |
| 6     | Literaturverzeichnis .....   | 178 |
|       | Lebenslauf.....  | 204 |
|       | Danksagung .....   | 205 |

# 1 Einleitung

## 1.1 Der Lebenszyklus von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* ist ein Hemiascomycet. Systematisch gehört sie der Gattung *Saccharomyces* (Zuckerhefen) an, die innerhalb der Abteilung Ascomycota (Schlauch-/Sprosspilze) in die Unterabteilung der Saccharomycotina eingeordnet wird. Die Saccharomycetales bilden hierbei die einzige Ordnung von Pilzen der Klasse Saccharomycetes, die als Saccharomycotina eine der drei Unterabteilungen der Schlauchpilze bildet.



**Abbildung 1: Differenzierungsmöglichkeiten von *S. cerevisiae***

Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* kann sich haploid oder diploid vermehren. Der Wechsel zwischen diesen Formen erfolgt bei guten Bedingungen durch Konjugation von haploiden Zellen unterschiedlichen Geschlechtstyps oder unter schlechten Bedingungen durch Sporulation der diploiden Zellen. Die Zellmorphologie ist vom jeweiligen Nährstoffangebot abhängig. Bestimmte Mangelbedingungen induzieren ausgehend vom Hefeform-Wachstum bei haploiden Zellen das adhäsive/invasive Wachstum bzw. bei diploiden das Pseudohyphenwachstum. Auch das Einleiten der stationären Phase wird von Mangelbedingungen bestimmt.

Vor allem durch ihre Eigenschaft, Zucker zu Ethanol und  $\text{CO}_2$  zu vergären, kommt *S. cerevisiae* eine besondere Stellung in der Lebensmittelindustrie zu, wo sie meist als Brau- und Backhefe verwendet wird. Darüber hinaus ist sie in der Molekularbiologie ein weit verbreiteter Modellorganismus für die Forschung an eukaryotischen Zellen. So

ist ihr Genom das erste komplett sequenzierte eukaryotische Genom gewesen (Goffeau *et al.*, 1996) und mittlerweile das am besten untersuchte eukaryotische Erbgut weltweit (Cliften *et al.*, 2003; Dujon *et al.*, 2004). Über die Populationsgenetik dieses Organismus ist allerdings bisher nur wenig bekannt. Als heterotropher und fakultativ anaerober Hefepilz ist *S. cerevisiae* wie auch andere Hefearten an sehr unterschiedliche Habitate angepasst. Es handelt sich bei diesem Hefepilz sicherlich um einen Organismus, der als stark domestiziert wahrgenommen wird und vielfach an anthropogene Fermentationsprozesse angepasst Verwendung findet. *S. cerevisiae*-Stämme, wie sie in der Fermentations-Industrie oder im Labor Verwendung finden, sind bereits so stark verändert, dass sie in natürlichen Habitaten selten, wenn überhaupt noch vorkommen. So werden Weinhefen, die nach der Fermentation in Trebern angereichert sind, der oft als Düngemittel in Weinbergen Verwendung findet, durch *Drosophila spec.* und andere Insekten scheinbar kaum auf andere Substrate übertragen. Der Ur-Ahne der heutigen Industrie-Stämme wird möglicherweise durch *S. cerevisiae* var. *tetrasporus* repräsentiert, der aus Exsudat europäischer Eiche durch Beijerinck gewonnen wurde (Phaff, 1986). Zahlreiche Stämme dieser Art konnten aus dem Intestinaltrakt wilder *Drosophila spec.* in der kalifornischen Sierra Nevada isoliert werden (Parle, 1957), wo Hefe als Quelle von Sterolen, Nukleinsäuren und Vitaminen dient (Phaff, 2001). Weitere Isolate dieses Stammes wurden auch in Japan aus Eichenrinde und Boden unterhalb dieser Bäume gewonnen (Yoneyama, 1957). Früchte und Trauben können ebenfalls Träger von *S. cerevisiae* sein (Mrak & Phaff, 1948).

Die Bäckerhefe gehört zu den dimorphen Organismen und kann nicht nur einzellig, sondern auch multizellulär als pseudohyphales Filament vorkommen. Bei ausreichender Versorgung mit Kohlenstoff- und Stickstoffquellen wachsen sowohl haploide als auch diploide Zellen in der einzelligen Hefeform auf der Substratoberfläche. Vegetatives Wachstum erfolgt bei haploiden Zellen durch axiale Sprossung, wodurch die Hefe auch die Bezeichnung *budding yeast* erhielt (engl. *to bud* für sprossen, knospen). Dabei findet die Zellteilung am proximalen Pol, nahe der Geburtsnarbe, statt. Diploide Zellen hingegen weisen ein bipolares Sprossungsmuster auf, wobei Tochterzellen zunächst am distalen Pol (die der Geburtsnarbe gegenüberliegende Seite), später an beiden Polen knospen. Die Mutterzellen knospen am proximalen Pol neben oder am distalen Pol gegenüber der letzten Sprossnarbe (Freifelder, 1960; Madden & Snyder, 1998).

Bei schlechter Kohlenstoffversorgung arretieren sowohl haploide als auch diploide Zellen ihren Zellzyklus in der G1-Phase und verbleiben bis zur Verbesserung des Nahrungsangebots in der stationären Phase.

Diploide Zellen können in Anwesenheit von fermentierbaren Kohlenstoffquellen und bei Versiegen der Stickstoffquelle filamentöse Pseudohyphen bilden (Gimeno *et al.*, 1992). Diese Zellen sind länger und dünner als die gewöhnlichen Hefeformzellen. Die Tochterzellen knospen bevorzugt am distalen Pol. Es wird in diesem Zusammenhang von einem unipolaren Knospungsmuster gesprochen. Da sich Tochter- und Mutterzellen jedoch nicht vollständig voneinander lösen und die Zellen stark am Substrat haften bleiben, bilden sich Zellverbände bzw. „Zellketten“, die sich nicht nur über das Substrat ausbreiten, sondern es auch invasiv besiedeln können (Gimeno *et al.*, 1992; Kron *et al.*, 1994).

Bei gleichzeitiger Abwesenheit einer Kohlenstoff- und Stickstoffquelle wird bei den diploiden Hefezellen die Meiose mit anschließender Sporulation eingeleitet. Dabei entstehen vier haploide Sporen, die sogenannte Tetrade. Zwei dieser Sporen haben den Paarungstyp a, die anderen beiden den Paarungstyp  $\alpha$ . Diese widerstandsfähigen Sporen keimen erst wieder unter besseren Bedingungen aus. Die haploiden Hefezellen können sich vegetativ vermehren oder bei guten Nährstoffbedingungen erneut konjugieren, wobei über Plasmogamie und Karyogamie sowie Bildung einer Zygote wieder das diploide Stadium erreicht wird. Die geschlechtliche Fortpflanzung ermöglicht die Rekombination der Erbanlagen und erhöht die genetische Vielfalt innerhalb der Population. Wild lebende Hefen können zwischen den beiden Geschlechtern wechseln, ein Vorgang, der Paarungswechsel genannt wird (engl. *Mating-type switching*). Diese Stämme sind homothallisch. Im Labor verwendete Stämme sind meist heterothallisch und weisen eine Mutation im Gen der HO-Endonuclease auf, wodurch ein Paarungstypwechsel unmöglich wird.

Auch bei haploiden Hefeform-Stämmen gibt es eine Differenzierungsform, die sich durch Bildung eines filamentähnlichen Zellverbandes auszeichnet, was als adhäsives/invasives Wachstum beschrieben wurde. Diese Wachstumsform wird unter anderem durch Glucosemangel ausgelöst (Cullen & Sprague, 2000; Roberts & Fink, 1994). Die Hefezellen verlängern sich nur leicht und zeigen ein bipolares Sprossungsmuster. Die Zellen teilen sich, bleiben aber miteinander verbunden und können so invasiv in bzw. adhäsiv auf ihrem Substrat wachsen. Haploid adhäsives/invasives Wachstum und die Pseudohyphenbildung der diploiden Zellen

werden unter dem Begriff filamentöses Wachstum zusammengefasst und dienen wahrscheinlich der Erschließung neuer Nährstoffquellen (Gimeno *et al.*, 1992).

Die hier beschriebenen morphologischen Veränderungen ähneln denen aus pathogenen Pilzen wie *Candida albicans* und *Ustilago maydis*. Dort geht die Fähigkeit der Pilze, ein Filament zu bilden, mit dem Grad ihrer Pathogenität einher (Bölker, 2001; Ernst, 2000).

## 1.2 Bedeutung der Adhäsion in Hefepilzen

Der Begriff Adhäsion beschreibt im Allgemeinen das Anhängen oder Anhaften verschiedener fester und flüssiger Stoffe aneinander. Für die nicht motilen Hefezellen ist die Adhäsion an biotische und abiotische Oberflächen von entscheidender Bedeutung für die Interaktion mit ihrer Umwelt, im Besonderen für den Kontakt zu anderen Zellen. Dadurch nimmt sie eine besondere Rolle bei der Entwicklung, Symbiose und Pathogenität von Hefepilzen ein.

So müssen während der Konjugation zweier Zellen unterschiedlichen Geschlechtstyps,  $\alpha$  und  $\alpha$ , diese zunächst aneinander haften, sie agglutinieren, um zu einer diploiden Zelle verschmelzen zu können (Lipke & Kurjan, 1992). Adhäsion verhindert aber auch, dass Zellen aus einer nährstoffreichen Umgebung weggetragen werden, und ermöglicht damit eine quasi sessile Lebensweise. Außerdem können durch sie Biofilme gebildet werden, die einen Schutz gegen lebensfeindliche Bedingungen bieten.



**Abbildung 2: Trennung der Biomasse vom Fermentationsprodukt - obergärige Bierhefe**

Etwa 0,5 - 1 Liter dickbreiige Reinzuchthefer werden für einen Hektoliter Weißbier verwendet. Die obergärige Hefe wird beim Brauen von Weißbieren eingesetzt. Durch intensive Gärung wird die Hefe nach oben getrieben und kann dort abgeerntet werden (Bild mit freundlicher Genehmigung von Weisses Bräuhaus G. Schneider & Sohn GmbH, Kelkheim).

Einige dieser adhäsiven Eigenschaften des Hefepilzes können industriell genutzt werden. So macht man sich die Zell-Zell-Adhäsion in der Brau- und Weinindustrie, aber auch bei der Bioethanolherstellung zu Nutze, indem man sehr kosteneffizient die Biomasse von den verschiedenen Fermentationsprodukten trennt (Abbildung 2) (Verstrepen *et al.*, 2003). Diesen natürlichen Prozess nennt man Flokkulation, da sich am Ende des Fermentationsprozesses, wenn der vorhandene Zucker verbraucht ist und in Ethanol und Kohlenstoffdioxid umgesetzt wurde, die Hefezellen aneinander lagern, zu Flocken aggregieren und ausfallen (Bony *et al.*, 1997; Stratford, 1989). Hierbei handelt es sich um eine reversible, asexuelle Art der Zell-Zell-Adhäsion. In Abhängigkeit der verwendeten Brauhefen sedimentieren die Flocken bei untergärigen Biersorten auf den Boden („Lager- und Pils“-Stämme) oder schwimmen im Falle von obergärigen Biersorten (Kölsch, Weizenbier) oder von Sherry-Wein auf der Oberfläche auf und bilden eine Grenzschicht zwischen Flüssigkeit und Luft, den sogenannten „Flor“ (Verstrepen *et al.*, 2003; Zara *et al.*, 2005).

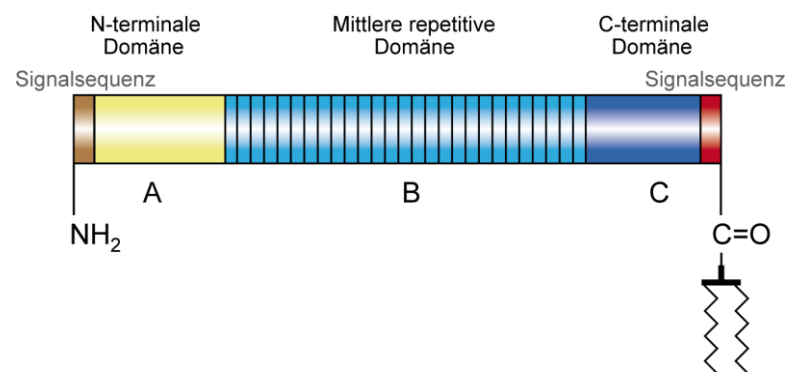
Diese einerseits positiven Effekte der Adhäsion sind auf der Kehrseite unerwünscht, beispielsweise bei der Bildung von Biofilmen in Prozessanlagen der Pharma-, Chemie- und Lebensmittelindustrie, wo sie die Produktkontamination begünstigen (Kumar, 1998). Angesichts der steigenden Anforderungen an die Pharma-, Chemie- und Lebensmittelindustrie bezüglich Produktsicherheit, Qualitätsverbesserungen, Effizienz und Rentabilität müssen daher die CIP (Cleaning in Place)-Zyklen in Prozessanlagen optimiert werden, was zum einen ökologisch sinnvoll ist, da es zu einer Reduzierung von Wasser- und Chemiebedarf führt. Andererseits können auch Produktverluste und die Reinigungszeit der Anlagen reduziert werden, was zu einer Verringerung der Gesamtbetriebskosten beiträgt.

Adhäsive Eigenschaften können bei pathogenen Hefepilzen allerdings auch ernstzunehmende Gefahren darstellen. So adhärieren opportunistisch pathogene Hefen wie *Candida albicans* und *Candida glabrata*, zwei nahe Verwandte der Bäckerhefe *S. cerevisiae*, sowohl an biotische Oberflächen, wie Epithelien (Calderone, 2001), als auch an abiotische, apolare Oberflächen, beispielsweise von Kathetern und Prothesen, und bekommen so einen Zugang in den Blutstrom und zu den inneren Organen des Patienten (Kojic & Darouiche, 2004; Nobile & Mitchell, 2006; Zhao *et al.*, 2006). Die Ausbildung von Biofilmen ist dabei eng mit der Entwicklung von multiresistenten Keimen verbunden und erschwert die Behandlung (Kumamoto & Vines, 2005). So hat

*C. albicans* einen Anteil von 8,8 % an nosokomialen Infektionen (Krankenhausinfektion; griech.: *Nosokomeion*: Krankenhaus) bei Intensivpatienten (Steinbrecher *et al.*, 2000). *Candida spec.* ist in den USA der vierthäufigste Erreger nosokomialer Infektionen (Pfaller & Diekema, 2007). 48 % aller in den USA diagnostizierten *Candida*-Infektionen des Blutkreislaufs werden durch *C. albicans* hervorgerufen, gefolgt von *C. glabrata* mit etwa 20 % (Pfaller *et al.*, 1998). Während ektopische Pilzinfektionen (von Haut und Schleimhäuten) meist harmlos verlaufen, führen systemische Infektionen, mit einem Übertritt des Pilzes in das Blutgefäßsystem und die anschließende Besiedlung innerer Organe, durch *Candida spec.* zu einer Sterblichkeitsrate von über 40 % (Pfaller & Diekema, 2007; Wisplinghoff *et al.*, 2004). Vor diesem Hintergrund ist es von wissenschaftlichem Interesse, die Funktion pilzlicher Adhäsion und Biofilmbildung besser zu verstehen, um sie für Industrie wie Medizin besser handhabbar zu machen.

### 1.3 Aufbau und Sekretion der Adhäsine in Hefepilzen

Die Adhäsion wird durch spezialisierte Zelloberflächenproteine realisiert, die man als Adhäsine bezeichnet. In *S. cerevisiae*, *C. albicans* und *C. glabrata* bilden sie eine Superfamilie, deren Mitglieder sich durch eine gemeinsame Struktur (bestehend aus drei Domänen) auszeichnen (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Die Domänenstruktur der Adhäsine**

Adhäsine bestehen aus mindestens drei diskreten Domänen. Die N-terminale Domäne (A, gelb) besitzt eine Signalsequenz für den Sekretorischen Weg (braun). Die mittlere Domäne (B, türkis) setzt sich aus einer Serin/Threonin-reichen, hoch repetitiven und stark glykosylierten Region zusammen, welche Adhäsion vermittelt. Die C-terminale Domäne (C, blau) trägt eine Signalsequenz (rot) für das kovalente Anfügen eines GPI (Glykosylphosphatidyl-Ankers) (schwarz).

Auf ihrem Weg an die Zelloberfläche erfahren die Adhäsine zahlreiche posttranslationale Modifikationen, wobei sie das Endoplasmatische Retikulum (ER),



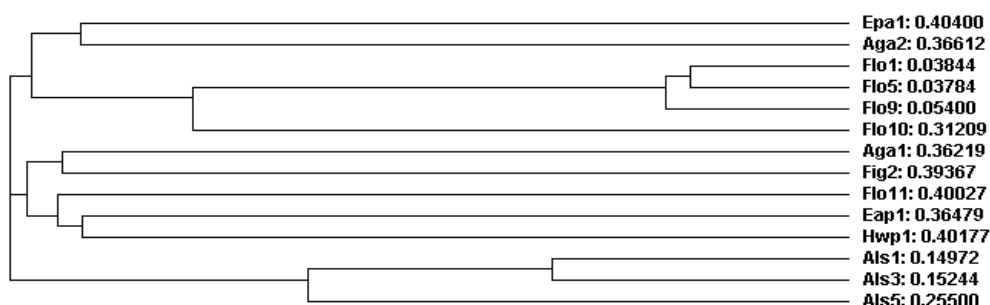
das Golgi-System und die Plasmamembran passieren, bis sie ihr Ziel, die Zellwand, erreichen (Bony *et al.*, 1997; Hoyer *et al.*, 1998).

Ein Adhäsine besteht aus mindestens drei diskreten Domänen: einem N-terminalen Teil, einer Mitteldomäne und einer C-terminalen Domäne. Der N-terminale Teil der Adhäsine trägt ein Sekretionssignal, das das Protein für den sekretorischen Weg kennzeichnet, und wird im ER prozessiert. Daran anschließend folgt N-terminal ein globulärer etwa 250 AS umfassender Kohlenhydrat- oder Proteinbindedomänen-Teil für die Ligandenbindung, z. B. von Zuckerresten glykosylierter Proteine auf der Oberfläche benachbarter Zellen (Groes *et al.*, 2002; Kobayashi *et al.*, 1998; Rigden, 2004; Stratford, 1992; Stratford & Assinder, 1991). Bestimmte Adhäsine gehören somit zur Gruppe der Lektine, einer strukturell diversen Gruppe von ubiquitär vorkommenden Proteinen, die keine enzymatische Funktion besitzen, aber an der Erkennung und Interaktion der Zellen beteiligt sind. Die Mitteldomäne der Adhäsine ist hoch repetitiv, mit einem Anteil von 35-55 % an Serin- und Threoninresten, die fast vollständig glykosyliert sind und die Zell-Zell-Interaktion unterstützen (Douglas *et al.*, 2007; Dranginis *et al.*, 2007). Rekombinationen zwischen den hoch repetitiven DNA-Motiven verschiedener Adhäsingene sind dabei die Quelle für eine große Diversität und Grundlage für die Bildung neuer Allele (Verstrepen *et al.*, 2004). Die Glykosylierung erfolgt im ER und Golgi-System, wobei die O-Glykosylierung durch die Übertragung einzelner Mannose-, Glucose- und N-Acetylglucosamin-Zuckerreste, meist beginnend mit der Übertragung von Mannose auf die vorhandenen Serin- und Threoninreste erfolgt. Die ebenfalls vorhandenen N-Glykosylierungen werden durch die gleichen Zucker aufgebaut, unterscheiden sich von den O-Glykosylierungen allerdings durch eine längere und stark verzweigte Struktur, wobei die Zuckerreste beginnend mit N-Acetylglucosamin an einen Asparaginrest innerhalb der Sequenz Asn-X-Ser/Thr angehängt werden, in der das X für eine beliebige Aminosäure steht (Bowman & Free, 2006; Gemmill & Trimble, 1999). Durch ihre Glykosylierungen sind die Proteine mit der Zellwand verbunden und bilden somit einen ihrer zentralen Bestandteile (Dranginis *et al.*, 2007; Smukalla *et al.*, 2008). Die manchmal für die Adhäsine verwendete Bezeichnung „Mannoproteine“ ist dem hohen Anteil von Mannoseresten an der Glykosylierung geschuldet. Neben den bereits beschriebenen Vorteilen der Glykosylierung, dem Aufbau einer Ligandenbindung über Zuckerreste zu benachbarten Zellen einerseits, sowie der Einbindung der Proteine über diese Reste in die Zellwand

andererseits, wird vermutet, dass die kurzen O-Glykosylierungen dem Adhäsion unter Mitwirkung von Kalzium-Ionen eine halbsteife Stäbchenform verleihen (Jentoft, 1990). Dadurch kann die mittlere Domäne des Proteins die Zellwand derart durchspannen, dass die N-terminale Domäne weit über die Glycocalix der Zelle hinaus in den extrazellulären Raum reicht und eine Ligandenbindung möglich wird (Dranginis *et al.*, 2007). Der hydrophobe C-terminale Teil der Adhäsine enthält eine Signalsequenz für das Anhängen eines Glykosylphosphatidyl (GPI)-Ankers und ist für die kovalente Verankerung des Proteins in der Zellwand verantwortlich (Bony *et al.*, 1997; Kapteyn *et al.*, 1999). Der GPI-Anker, eine Lipid- und Oligosaccharid-enthaltende Struktur wird im ER kovalent an den C-Terminus der Adhäsine angefügt (Bony *et al.*, 1997; Udenfriend & Kodukula, 1995). Nach erfolgter Sekretion der Adhäsine wird der überwiegende Teil des GPI-Ankers abgetrennt und das Protein über den noch vorhandenen „Ankerrest“ kovalent mit dem  $\beta$ -1,6-Glucan der Zellwand verknüpft (Bowman & Free, 2006; Klis *et al.*, 2002; Lipke & Ovalle, 1998; Lu *et al.*, 1995; Pittet & Conzelmann, 2007).

## 1.4 Adhäsinfamilien

Trotz ihrer Gemeinsamkeiten, nämlich einem ähnlichen Aufbau und der Vermittlung von Adhäsion, gibt es viele verschiedene Adhäsine. So unterscheiden sich die Adhäsine einer Zelle in der Art ihrer Spezialisierung und stattdessen die Zelle so mit einer Bandbreite verschiedener Adhäsionseigenschaften aus. Innerhalb der Ordnung der *Saccharomycetales* besitzt jede Gattung der Hefepilze verschiedene Adhäsinfamilien, die ihre individuelle Spezialisierung an ihr Habitat widerspiegeln (Tabelle 1; Abbildung 4) (Guo *et al.*, 2000; Sheppard *et al.*, 2004; Verstrepen *et al.*, 2004).



**Abbildung 4:** Cladogram der phylogenetischen Beziehungen der Adhäsine aus *S. cerevisiae*, *C. albicans* und *C. glabrata*

Die Distanz ist hinter dem jeweiligen Proteinnamen angegeben.

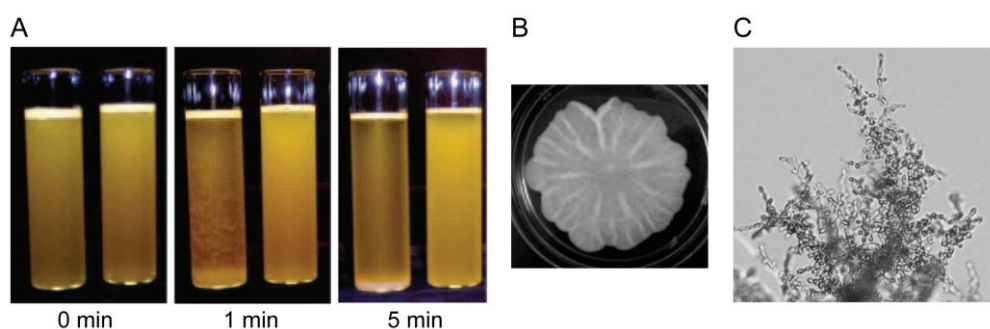
**Tabelle 1: Adhäsinfamilien verschiedener Hefen – Adhäsine, ihre Liganden und ihre Funktion**  
(modifiziert nach (Dranginis *et al.*, 2007))

| Spezies              | Adhäsine             | Ligand                        | Bekannte physiologische Funktion   | Referenz   |
|----------------------|----------------------|-------------------------------|--|--|
| <i>S. cerevisiae</i> | Flo1                 | $\alpha$ -Mannoside           | Flokkulation, Flo1-Typ   | (Bidard <i>et al.</i> , 1995; Stratford & Assinder, 1991; Teunissen <i>et al.</i> , 1993; Watari <i>et al.</i> , 1994)                                     |
|                      | Lg-Flo1              | $\alpha$ -Mannoside           | Flokkulation, New-Flo1-Typ   | (Kobayashi <i>et al.</i> , 1998)   |
|                      | Flo5                 | $\alpha$ -Mannoside           | Flokkulation, Flo1-Typ   | (Bidard <i>et al.</i> , 1994; Teunissen <i>et al.</i> , 1995)  |
|                      | Flo9                 | $\alpha$ -Mannoside           | Flokkulation, Flo1-Typ   | (Guo <i>et al.</i> , 2000; Teunissen & Steensma, 1995)   |
|                      | Flo10                | $\alpha$ -Mannoside           | Flokkulation, Flo1-Typ   | (Guo <i>et al.</i> , 2000; Teunissen & Steensma, 1995)   |
|                      | Flo11                | unbekannt                     | Zell-Zell-Adhäsion, filamentöses und invasives Wachstum, Biofilmbildung, Adhäsion an Plastik   | (Bayly <i>et al.</i> , 2005; Guo <i>et al.</i> , 2000; Lambrechts <i>et al.</i> , 1996; Lo & Dranginis, 1996; Lo & Dranginis, 1998; Reynolds & Fink, 2001) |
|                      | a-Agglutinin         | $\alpha$ -Agglutinin          | Paarung, besteht aus zwei Untereinheiten: Aga1 und Aga2. AGA2 wird nur von a-Zellen exprimiert | (Cappellaro <i>et al.</i> , 1994; Guo <i>et al.</i> , 2000; Huang <i>et al.</i> , 2003; Shen <i>et al.</i> , 2001)   |
|                      | $\alpha$ -Agglutinin | a-Agglutinin                  | Paarung, erkennt spezifisch Aga2   | (Cappellaro <i>et al.</i> , 1994; Lipke & Kurjan, 1992; Wojciechowicz <i>et al.</i> , 1993; Zhao <i>et al.</i> , 2001)                                     |
| <i>C. albicans</i>   | Fig2                 | unbekannt                     | Paarung, invasives Wachstum während der Paarung  | (Guo <i>et al.</i> , 2000; Jue & Lipke, 2002; Zhang <i>et al.</i> , 2002)  |
|                      | Als1                 |                               | Aggregation, Bindung an Endo- und Epithelzellen  | (Fu <i>et al.</i> , 1998; Green <i>et al.</i> , 2005; Hoyer & Hecht, 2000; Kamai <i>et al.</i> , 2002)   |
|                      | Als3                 |                               | Biofilmbildung   | (Nobile & Mitchell, 2006; Oh <i>et al.</i> , 2005; Zhao <i>et al.</i> , 2006)  |
|                      | Als5                 | Peptide                       | Aggregation, Bindung an Epithelzellen  | (Gaur <i>et al.</i> , 2002; Hoyer, 2001; Klotz <i>et al.</i> , 2004; Rauceo <i>et al.</i> , 2006; Sheppard <i>et al.</i> , 2004)                           |
|                      | Eap1                 |                               | Adhäsion an Plastik  | (Li & Palecek, 2003; Li & Palecek, 2005)   |
| <i>C. glabrata</i>   | Hwp1                 | Substrat für Transglutaminase | Bindung an Epithelzellen   | (Nobile & Mitchell, 2006; Staab <i>et al.</i> , 2004)  |
|                      | Epa-Adhäsine         | $\beta$ -Galaktoside          | Bindung an Epithelzellen   | (De Las Peñas <i>et al.</i> , 2003; Domergue <i>et al.</i> , 2005; Kaur <i>et al.</i> , 2005)  |

#### 1.4.1 Adhäsine aus *S. cerevisiae*

Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* kodiert für fünf Flokkuline: Flo1, Flo5, Flo9, Flo10 (Teunissen & Steensma, 1995) und Flo11 (Lambrechts *et al.*, 1996; Lo & Dranginis, 1996), von denen jedoch nur *FLO11* in den meisten Laborstämmen unter vegetativen Wachstumsbedingungen exprimiert wird (Tabelle 1; Abbildung 4). Die Flokkuline Flo1, Flo5 und Flo9 weisen eine hohe Ähnlichkeit zueinander auf (Bidard *et al.*, 1994;

Teunissen *et al.*, 1993; Teunissen *et al.*, 1995; Watari *et al.*, 1994), wobei Flo5 eine 96%ige und Flo9 eine 94%ige Sequenzähnlichkeit zu Flo1 aufweist. Flo10 besitzt hingegen nur eine 58%ige Sequenzähnlichkeit zu Flo1, wobei die Ähnlichkeit des N-Terminus aber 81,9 % beträgt (Teunissen *et al.*, 1993). Flo11 (Lambrechts *et al.*, 1996; Lo & Dranginis, 1996) besitzt die gleiche Struktur wie die anderen Flokkuline, weist jedoch nur eine 21%ige Sequenzähnlichkeit zu Flo1 auf. Es ist somit der entfernteste Verwandte der Flokkulin-Familie (Abbildung 4), was sich auch in seinen Eigenschaften widerspiegelt.



**Abbildung 5: Verschiedene Phänotypen, die durch Flo11 induziert werden**

A) Die Flokkulation von *S. cerevisiae* var. *diastaticus* ist Flo11-abhängig. Die Zellen wurden zuvor gevortext und nach der angegebenen Zeit fotografiert (0 min, 1 min und 5 min; jeweils links ist der Wildtypstamm, rechts ein *flo11*-Deletionsstamm zu sehen). B) Der *S. cerevisiae*-Stamm (Σ1278b-Hintergrund) bildet Flo11-abhängig Biofilme aus einer einzelnen Kolonie auf halbfestem Agar. C) Ein diploider *S. cerevisiae*-Stamm (Σ1278b-Hintergrund) bildet Flo11-abhängig verzweigte Zellketten, sogenannte Pseudohyphen als Antwort auf Stickstoffmangel. (A und B modifiziert aus (Dranginis *et al.*, 2007))

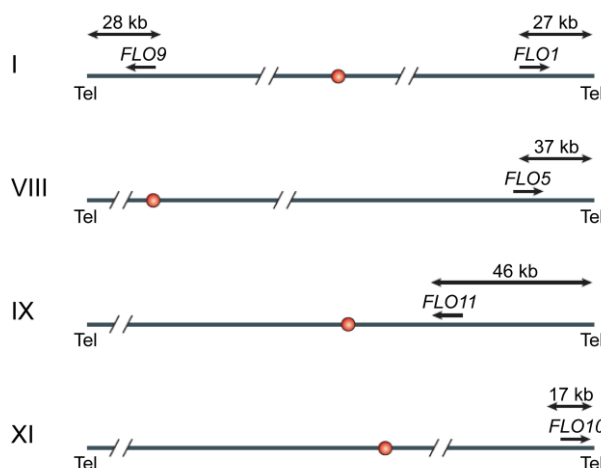
*FLO1*, *FLO5*, *FLO9* und *FLO10* vermitteln eine lektinähnliche, zuckerabhängige Zell-Zell-Adhäsion (Flokkulation) (Kobayashi *et al.*, 1998), während *FLO11* für die Adhäsion an Substrat und Plastik, sowie die Biofilmbildung wichtig ist (Abbildung 5 B) (Guo *et al.*, 2000; Reynolds & Fink, 2001) und in diploiden Zellen die Bildung von Pseudohyphen unterstützt (Abbildung 5 C) (Lambrechts *et al.*, 1996; Lo & Dranginis, 1998). So konnte im Σ1278b- und S288c-Stammhintergrund gezeigt werden, dass die Überexpression von *FLO1* zu einer starken und von *FLO10* zu einer schwachen kalziumabhängigen Flokkulation führt (Guo *et al.*, 2000; Van Mulders *et al.*, 2009). Die *FLO11*-Überexpression im Σ1278b-Stammhintergrund resultiert hingegen nur in einer sehr schwachen kalziumunabhängigen Flokkulation, während eine Flokkulation im *S. cerevisiae* S288c-Stammhintergrund überhaupt nicht nachweisbar ist (Guo *et al.*, 2000; Van Mulders *et al.*, 2009; Verstrepen & Klis, 2006). Lediglich für *S. cerevisiae* var. *diastaticus* konnte eine Flo11-abhängige Flokkulation nachgewiesen werden (Abbildung 5 A) (Bayly *et al.*, 2005; Lo & Dranginis, 1996), was in Sequenz-

unterschieden oder unterschiedlicher Glykosylierung begründet sein kann, bisher aber nicht geklärt werden konnte.

Flo11 bindet überwiegend an Peptide statt an Zucker und erhöht die Zell-Oberflächenhydrophobizität, die die hydrophobe Interaktion zwischen den Hefezellen und bestimmten abiotischen Oberflächen ermöglicht, wobei die Interaktion zwischen Protein und Oberfläche bisher noch wenig erforscht ist (Guo *et al.*, 2000; Kang & Choi, 2005; Van Mulders *et al.*, 2009). Unter Nährstoffmangelbedingungen nimmt Flo11 eine zentrale Rolle bei der Organisation der Versorgung mit neuen Nährstoffen ein. So ermöglicht Flo11 unter Stickstoffmangelbedingungen in diploiden Zellen die Bildung von filamentösen Pseudohyphen, die den nicht motilen Hefezellen die Erschließung neuer Nährstoffquellen ermöglichen (Gimeno & Fink, 1992; Gimeno *et al.*, 1992). Flo11 hält dabei die Zellen in verzweigten Ketten zusammen, beeinflusst also die Zellmorphologie und unterstützt die Substratinvasion (Gancedo, 2001; Palecek *et al.*, 2000). Flo11 weist strukturelle Ähnlichkeiten zu den membrangebundenen Mucinen der Säugetiere auf und wurde deshalb bei seiner Entdeckung offiziell mit *MUC1* benannt (Lambrechts *et al.*, 1996). Wie auch die Flokkuline tragen die Mucine einen hoch repetitiven Bereich, der stark glykosyliert ist und einen hohen Anteil an Serin- und Threoninresten aufweist, allerdings keinerlei Sequenzhomologie zu *FLO11* besitzt (Hilkens *et al.*, 1992; Lambrechts *et al.*, 1996; Spicer *et al.*, 1995). Mucine sitzen in der Membran epithelialer Zellen oder werden sezerniert und übernehmen so eine Barrierefunktion der Schleimhäute (Mucosa) (Spicer *et al.*, 1995). Die Überexpression von Mucinen führt zu einem Verlust der zellulären Adhäsionseigenschaften. Die erhöhte Expression von Mucinen in Tumorzellen scheint dabei eine wichtige Rolle bei der Invasion in neues Gewebe zu spielen (Hilkens *et al.*, 1992). Flo1 und Flo5, wie auch Flo11 werden als „Flo1-Typ Flokkuline“ bezeichnet, deren Aktivität durch Mannose, nicht aber durch Glucose inhibiert wird (Bayly *et al.*, 2005; Sieiro *et al.*, 1995; Stratford & Assinder, 1991). Eine weitere als Lg-Flo1 bezeichnete Variante des Flokkulins Flo1 wird in die Gruppe der „NewFlo-Typ Flokkuline“ eingeordnet. Bei dieser Gruppe handelt es sich um Flokkuline, deren Aktivität durch Mannose und Glucose oder Glucose-Oligomere wie Maltose inhibiert wird (Sato *et al.*, 2002), wobei die Zucker bindenden Domänen von Flo1 und Lg-Flo1 die N-terminal exponierten Domänen sind (Kobayashi *et al.*, 1998). Die meisten industriell genutzten Braustämme, deren Flokkulation durch Zucker im Medium kompetitiv inhibiert wird, gehören dem

„NewFlo-Typ“ an. Da die freien Zuckermoleküle die Bindestellen der Flokkuline besetzten, werden die Glykosylierungen anderer Zellen nicht erkannt. Erst wenn alle fermentierbaren Zucker in Ethanol umgesetzt wurden, beginnt die Flokkulation.

*S. cerevisiae* kodiert für drei weitere Adhäsine, die ausschließlich Protein-Protein Interaktion vermitteln. Hierzu gehören Fig2,  $\alpha$ -Agglutinin und  $\alpha$ -Agglutinin, wobei es sich bei den beiden letzteren um Agglutinine handelt, die speziell für die Paarung von jeweils einem der Paarungstypen exprimiert werden. Die Bindung dieser beiden Agglutinine aneinander erleichtert die Paarung und Fusion der haploiden Zellen (Lipke & Kurjan, 1992). Fig2 wird ebenfalls während der Paarung exprimiert und ist eine Komponente des Zellwandstress-Signalwegs und somit verantwortlich für die Aufrechterhaltung der Integrität der Zellwand (Jue & Lipke, 2002). Eine Deletion von *FIG2* führt zu verschiedenen Defekten während des Paarungsvorgangs, die sowohl morphogenetischer Art sind und Zellpolarisations- und Zellfusionsdefekte hervorrufen, als auch eine Hyperagglutination der Zellen induzieren (Erdman *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2002).



**Abbildung 6: Chromosomale Lokalisation der *FLO*-Gene in *S. cerevisiae***

Die Nummern links geben das Chromosom an, auf dem das jeweilige *FLO*-Gen lokalisiert ist. Die roten Punkte deuten das Zentromer an. Die stillgelegten *FLO*-Gene sind alle innerhalb der 40 kb Telomerregion (Tel) lokalisiert. *FLO11* ist weder zentromer, noch telomer lokalisiert. (modifiziert aus (Verstrepen *et al.*, 2004))

Der am häufigsten verwendete *S. cerevisiae* S288c-Laborstamm wird in dieser Arbeit nicht verwendet, da er keine adhäsiven Eigenschaften besitzt. Hintergrund ist, dass *FLO8*, der transkriptionelle Aktivator von *FLO1*, *FLO10* und *FLO11*, eine Nonsense-Mutation trägt und dadurch nicht exprimiert ist (Bester *et al.*, 2006; Fichtner *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 1996). *FLO1*, *FLO5*, *FLO9* und *FLO10* liegen zudem nahe der

Telomerregion (~ 10 bis 40 kb entfernt) der sie tragenden Chromosomen und sind somit epigenetisch stillgelegt (Abbildung 6) (Halme *et al.*, 2004).

Aus diesem Grund wurde für die vorliegende Arbeit der *S. cerevisiae*  $\Sigma$ 1278b-Stamm gewählt, der lediglich *FLO11* exprimiert, wodurch eine phänotypische Veränderung der Adhäsion eindeutig zugeordnet werden kann. *FLO1* trägt in diesem Stammhintergrund zwei große Deletionen innerhalb seines ORFs, außerdem fehlt eine Bindestelle für den Transkriptionsaktivator Flo8 (Fichtner *et al.*, 2007).

#### 1.4.2 Adhäsine aus opportunistisch pathogenen Hefepilzen

Die Spezifität der Adhäsine aus opportunistisch pathogenen Hefepilzen ist überwiegend auf die Adhäsion an Wirtsepithelien ausgerichtet. So kodiert die hauptsächlich exprimierte Adhäsinfamilie der *ALS* (Agglutinin Like Sequence)-Gene in *C. albicans* (Filler, 2006; Sundstrom, 2002) und die Adhäsinfamilie der *EPA* (Epithelial Adhesin)-Gene in *C. glabrata* für Proteine, die auf die Adhäsion an Säugetierepithelien spezialisiert sind (Tabelle 1; Abbildung 4) (De Las Peñas *et al.*, 2003; Hoyer, 2001; Kumamoto, 2005; Li & Palecek, 2003).

Ähnlich wie die einzelnen Flokkulin-Gene in der Bäckerhefe unterscheiden sich auch die aus acht glykosylierten Proteinen bestehenden *ALS*-Gene in *C. albicans* in ihrer Spezifität. Als-Proteine zeigen eine typische Drei-Domänenstruktur. Sie tragen eine etwa 300 AS große N-terminale Immunglobulin ähnliche Domäne, die mit der der sexuellen  $\alpha$ -Agglutinine (Sag1) in *S. cerevisiae* verglichen werden kann (Chen *et al.*, 1995; Hoyer, 2001; Sheppard *et al.*, 2004) und sich für die adhäsive Funktion verantwortlich zeichnet (Sheppard *et al.*, 2004). Die zentrale Domäne besteht aus threoninreichen Tandemwiederholungen einer 36 AS-Sequenz. Die an Serin- und Threoninresten reiche C-terminale Domäne ist in ihrer Länge und Sequenz variabel (Gaur & Klotz, 1997), aber wie die Mitteldomäne in allen Als-Proteinen mit N- und O-vernetzten Kohlenhydraten hoch glykosyliert (Kapteyn *et al.*, 2000). Als-Adhäsine vermitteln Adhäsion an Epithelien, Hefeaggregation und Biofilmbildung, wobei die durch Als-Proteine vermittelte Aggregation  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig erfolgt und sich so von der Flokkulation in *S. cerevisiae* unterscheidet. Die Als-Proteine Als1, Als3 und Als5 wurden sehr genau charakterisiert und übernehmen eine Hauptrolle bei der Adhäsion von *C. albicans* an Wirtsepithelen. Für Als1 und Als3 ist die präferierte Adhäsion an

Endothel- und Epithelgewebe bekannt (Loza *et al.*, 2004), wobei Als3 auch die Biofilmbildung unterstützt (Zhao *et al.*, 2006). Als5 bindet hauptsächlich an Proteine der extrazellulären Matrix (Gaur & Klotz, 1997; Rauceo *et al.*, 2006). Die ALS-Gene werden in Abhängigkeit von der Wachstumsphase der Hefezellen und ihrer morphologischen Form differentiell exprimiert (Green *et al.*, 2005; Hoyer *et al.*, 2001; Hoyer & Hecht, 2000; Hoyer *et al.*, 1998). So wurde die ALS-Gen-Expression an humanem klinischem Probenmaterial und an einem Candidiasismodell mittels reverser Transkriptions-PCR untersucht. Es ergab sich dabei eine Expression aller ALS-Gene, wobei die Expression von *ALS1*, *ALS2*, *ALS3* und *ALS9* am häufigsten nachgewiesen werden konnte (Cheng *et al.*, 2005). Diese Ergebnisse konnten am Mausmodell bestätigt werden (Green *et al.*, 2005). Bei zwei weiteren *C. albicans*-Adhäsinen, Eap1 und Hwp1, handelt es sich um Adhäsine mit besonderen Eigenschaften, die das adhäsive Repertoire der Zellen ergänzen: Eap1 (Enhanced Adherence to Polystyrene) vermittelt die Bindung an Plastikoberflächen und ist gegenüber Scherkräften unempfindlich (Kumamoto & Vines, 2005; Li & Palecek, 2003). Eap1 hat die gleiche Grundstruktur wie die GPI-verankerten Lektine und peptidbindenden Proteine und vermittelt der Zelle eine stabile Adhäsion an Katheter und andere medizinische Produkte wie Prothesen. Das Zellwandprotein Hwp1 (Hyphal cell Wall Protein) stellt über eine wirtseigene Transglutaminase eine kovalente Bindung zum Wirtsepithel her (Staab *et al.*, 1999). Diese Verbindung ist gegenüber Scherkräften resistent und in Abwesenheit von Proteolyse dauerhaft, so dass klinisch oropharyngeale *C. albicans*-Kolonien durch Kratzen nicht entfernt werden können (Naglik *et al.*, 2006). Als die potentesten Adhäsionsinhibitoren für verschiedene *C. albicans*-Stämme an humanes Wangenepithel sind Fucose, Glucosamin und N-Acetyl-Glucosamin bekannt (Critchley & Douglas, 1987).

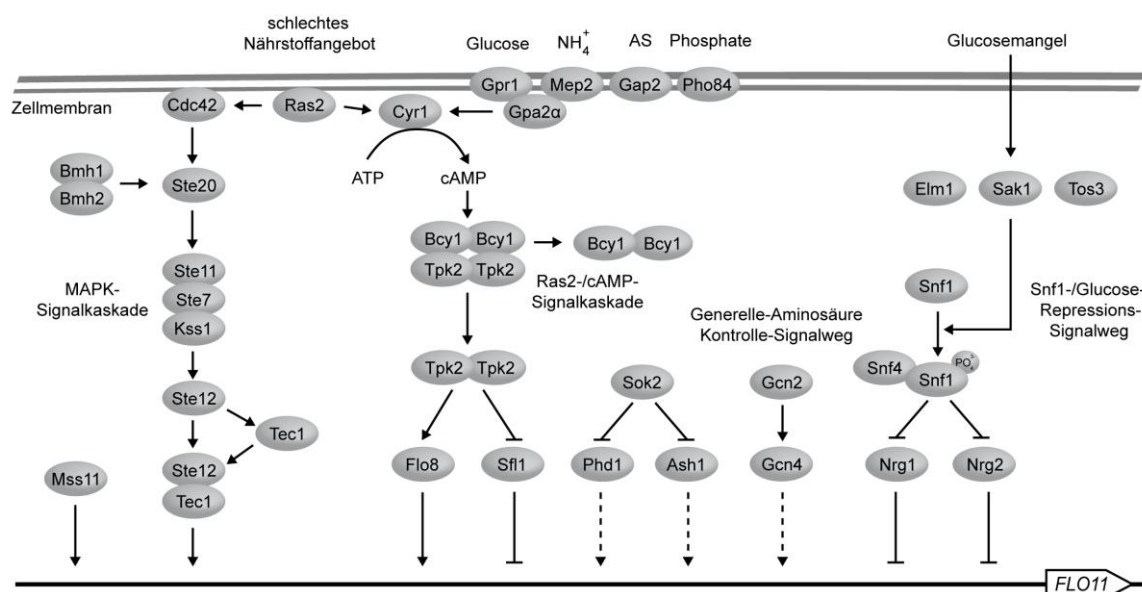
In dem pathogenen Hefepilz *C. glabrata* wird die Hauptgruppe der Adhäsine durch die Familie der EPA-Gene kodiert (De Las Peñas *et al.*, 2003), wobei das Genom je nach Stammhintergrund bis zu 23 EPA-verwandte Sequenzen enthält (Kaur *et al.*, 2005). Die Epa-Proteine gehören ebenso wie die Flokkuline und Agglutinine aus *S. cerevisiae* zu den lektin-ähnlichen Pilzadhäsinen. In ihrer Gesamtstruktur sind die Epa-Proteine den Als-Proteinen aus *C. albicans* sehr ähnlich, obgleich über die Funktion der meisten Epa-Proteine und den Zeitpunkt ihrer Expression im Verlauf einer Infektion wenig bekannt ist. Für Epa1 konnte eine Bindung an Laktose und N-Acetyllaktosamine nachgewiesen



werden, wobei die Adhäsion von Epa1 an N-Acetyllaktosamine enthaltende Glycokonjugate auf Säugetierepithelzellen durch beide Zucker gezielt inhibiert werden kann (Cormack *et al.*, 1999). Die Primärstruktur von Epa1 weist eine leichte Homologie zu dem Flokkulin Flo1 aus *S. cerevisiae* auf (Sundstrom, 2002), zumal beide Proteine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig funktionieren. Für Epa6 und Epa7 konnte *in vitro* ebenfalls eine Adhäsion an Epithelien nachgewiesen werden (Castaño *et al.*, 2005; Domergue *et al.*, 2005). Durch ein Glycan-Microarrayscreening und Zuckerinhibitionsversuche konnte die Bandbreite gebundener Liganden und die Kohlenhydratbindespezifität von Epa1, Epa6 und Epa7 genauer bestimmt werden (Zupancic *et al.*, 2008). Epa6 besitzt das größte Ligandenbindespektrum der drei Proteine und bindet an Liganden mit einer terminalen Galactose. Mit dem zweitgrößten Bindspektrum folgt Epa1, welches die meisten Glycane mit terminaler Galactose bindet, die an einen Galactose- oder Glucoserest oder eines ihrer aminoacetylierten Derivate durch eine  $\beta$ -Bindung gebunden ist. Epa7 besitzt die geringste Ligandenspezifität der drei Proteine und bindet fast ausschließlich an Liganden mit terminal lokalisiertem Glucoserest in  $\beta$ 1-3- oder  $\beta$ 1-4-Bindung an Galactose oder Glucose. Durch Epa6 und Epa7 vermittelte Adhäsion kann an Epithelien *in vitro* durch Lactose, bei Epa6 zusätzlich durch Galactose inhibiert werden. Epa6 und Epa7 besitzen eine 92%ige Aminosäure-Sequenzidentität und erhalten ihre Spezifität durch eine fünf Aminosäure große N-terminal lokalisierte Ligandenbindedomäne (Zupancic *et al.*, 2008). Wie die meisten *EPA*-Gene sind auch *EPA6* und *EPA7* im Gegensatz zu *EPA1* in subtelomeren Regionen lokalisiert, die meist stillgelegt sind, also einer lokalen Modifikation des Chromatins durch DNA-Hypermethylierung, Histondeacetylierung, Histonmethylierung oder erhöhter Proteinbeladung der DNA unterliegen, ähnlich dem subtelomeren Stilllegen von Genen in *S. cerevisiae* (Castaño *et al.*, 2005; De Las Peñas *et al.*, 2003). Man spricht in diesem Zusammenhang von Transcriptional Gene Silencing (TGS). Die subtelomere Stilllegung erfolgt dabei derart, dass sie die Pathogenität unter verschiedenen Umgebungsbedingungen und Niacin-Limitierung beeinflusst (De Las Peñas *et al.*, 2003; Domergue *et al.*, 2005).

## 1.5 Das Flokkulin *FLO11* – Regulation und beteiligte Signalwege

Adhäsine werden nicht konstitutiv exprimiert, sondern unterliegen einer komplexen transkriptionellen Kontrolle. Unter den am besten untersuchten Aspekten der pilzlichen Adhäsion sind zahlreiche Signalwege zu finden, die Umgebungsbedingungen zu einer transkriptionellen Antwort der Adhäsingene transformieren. Viele Signalwege wurden hinsichtlich ihres Einflusses auf das *FLO11*-Gen aus *S. cerevisiae* untersucht, das für das einzige im  $\Sigma 1278b$ -Stammhintergrund exprimierte Adhäsine kodiert. Der Einfluss von pH auf die *FLO11*-Expression und die zelluläre Adhäsion ist jedoch bisher weitestgehend unbekannt. Man vermutet, dass nicht nur die anderen *FLO*-Gene, sondern auch die Adhäsine aus pathogenen Hefen durch ähnliche Mechanismen wie das *FLO11*-Gen reguliert werden. So ist z. B. für *C. albicans* bekannt, dass die *ALS*-Genexpression durch orthologe Signalwege gesteuert wird, die in *S. cerevisiae* die Adhäsion regulieren (Kaur *et al.*, 2005; Lengeler *et al.*, 2000; Liu, 2001; Maidan *et al.*, 2005).



**Abbildung 7: Signalwege der *FLO11*-Expression**

Die *FLO11*-Expression wird durch mehrere Signalwege reguliert, die Signale verschiedenster Umweltbedingungen weiterleiten. Nähere Erläuterungen erfolgen im Text.

Der *FLO11*-Promotor ist mit etwa 2,8 kb einer der größten Promotoren im Hefegenom, deren Durchschnittsgröße bei etwa 300 bp liegt (Dujon, 1996; Rupp *et al.*, 1999). Dies lässt eine komplexe Regulation vermuten und so ist es nur wenig überraschend, dass zahlreiche Signalwege für die *FLO11*-Expression bei der Antwort auf Umgebungssignale eine wichtige Rolle spielen. Zu den bekannten Signalwegen mit

Einfluss auf die *FLO11*-Expression gehören der Snf-/Glucose-Repressionssignalweg, der Ras2-/cAMP-abhängige Protein-Kinase-A- (PKA)-Signalweg, die Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase (MAPK)-Signalkaskade des filamentösen Wachstums und der Generelle-Aminosäure-Kontroll-Signalweg (Abbildung 7).

### **1.5.1 Snf1-/Glucose-Repressions-Signalweg**

Der Snf1- oder Glucose-Repressions-Signalweg hat einen Einfluss auf die *FLO11*-Expression (Abbildung 7). Bei ausreichender Verfügbarkeit von Glucose im Medium wird diese durch Hexose-Transporter (Hxt) aufgenommen. Die Verfügbarkeit von Glucose führt bei Hefezellen, die durch alternative Kohlenstoffquellen versorgt werden zu einer Dephosphorylierung der aktiven Snf1 (Sucrose Non Fermenting)-Kinase durch den Reg1/Glc7-Phosphatase-Komplex (Santangelo, 2006). Der Snf1-Proteinkinase-Komplex ist ein heterotrimerer Komplex, der sich in *S. cerevisiae* aus der Serin/Threonin-Kinase Snf1 als katalytischer Untereinheit, der  $\gamma$ -Untereinheit Snf4 und einer der drei  $\beta$ -Untereinheiten Gal83, Sip1 und Sip2 zusammensetzt (Jiang & Carlson, 1997). Unter Glucosemangel wird das zentrale Element dieses Signalwegs, Snf1, aktiviert und in den Kern importiert, was bei Wachstum auf fermentierbaren Kohlenstoffquellen ausbleibt (Vincent *et al.*, 2001; Wilson, 1996). Die Aktivierung beinhaltet die Bindung der regulatorischen  $\gamma$ -Untereinheit Snf4 des Protein-Kinase-Komplexes an Snf1, wodurch die Autoinhibition von Snf1 verhindert wird (Carlson, 1999; Celenza & Carlson, 1989). Zusätzlich wird Snf1 an dem konservierten Threoninrest an Position 210 durch eine der drei zueinander redundanten Kinasen Tos3, Elm1 und Sak1 phosphoryliert (Hong *et al.*, 2003). Es ist bekannt, dass das filamentöse Wachstum von Snf1 durch die Inaktivierung der Transkriptionsrepressoren Nrg1 und Nrg2 durch Derepression von *FLO11* realisiert wird (Kuchin *et al.*, 2002). Wie es allerdings zur Snf1-abhängigen Derepression von Nrg1- und Nrg2-reprimierten Genen unter Glucosemangel kommt, ist unklar. Nrg1 liegt unabhängig von der Versorgung der Zelle mit Glucose im Zellkern vor (Vyas *et al.*, 2001).

### 1.5.2 Ras2-/cAMP-Signalweg

Die Aktivierung des Ras2-/cAMP-Signalwegs stimuliert das diploide Pseudohyphenwachstum und das haploid adhäsive Wachstum und ist dabei einer der Hauptregulatoren bei der Verarbeitung Nährstoff-bedingter Einflüsse (Abbildung 7). Bei der Kontrolle des adhäsiven Wachstums durch die Expression von *FLO11* agiert der Ras2-/cAMP-Signalweg parallel zum MAPK-Signalweg des filamentösen Wachstums. Beide Signalwege können durch Ras2 aktiviert werden (Chavel *et al.*, 2010; Mösch *et al.*, 1999). Der Ras2-/cAMP-Signalweg kann außerdem unter entsprechenden Bedingungen auch durch Glucose (über den Nährstoffsensor Gpr1), Ammonium (über die Ammonium Permease Mep2), Aminosäuren (über die generelle Aminosäurepermease Gap1) und Phosphate (über den Hochaffinitätstransporter für inorganisches Phosphat Pho84) aktiviert werden (Thevelein *et al.*, 2008). Des Weiteren erhöht die intrazelluläre Phosphorylierung von Glucose die Aktivität der Adenylat-Zyklase Cyr1 (Rolland *et al.*, 2001). Bei der Aktivierung durch Glucose und Saccharose wird ein G-gekoppeltes Rezeptorsystem aktiviert, das aus dem Rezeptor Gpr1 und dem G- $\alpha$ -Protein Gpa2 besteht (Lemaire *et al.*, 2004; Rolland *et al.*, 2000). Der aktivierte Gpr1/Gpa2-Komplex führt dann zu einer weiteren Zunahme der Cyr1-Aktivität, was in einem kurzzeitigen cAMP-Anstieg resultiert (Colombo *et al.*, 1998; Kraakman *et al.*, 1999; Rolland *et al.*, 2000). Die hohe interzelluläre cAMP-Konzentration aktiviert durch Bindung von cAMP an die inhibitorische Untereinheit Bcy1 die PKA (Toda *et al.*, 1987a; Toda *et al.*, 1985), die sich aus einem Dimer der regulatorischen Untereinheit Bcy1 und einer der drei katalytischen Untereinheiten Tpk1, Tpk2 und Tpk3 zusammensetzt (Toda *et al.*, 1987b). Durch die Bindung des cAMP an Bcy1 trennen sich beide Dimerpaare und die katalytischen Untereinheiten werden aktiv (Cannon & Tatchell, 1987). Die verschiedenen katalytischen Untereinheiten der PKA übernehmen dabei unterschiedliche Aufgaben während des pseudohyphalen Wachstums. So stimuliert Tpk2, das meist als Aktivator wirkt, das pseudohyphale Wachstum, indem es Sfl1 (Supressor of Flocculation) durch Phosphorylierung reprimiert und Flo8, einen positiven Regulator von *FLO11*, aktiviert. Flo8 wiederum bindet dann an den *FLO11*-Promotor und initiiert die *FLO11*-Expression (Gagiano *et al.*, 2002; Pan & Heitman, 1999; Pan & Heitman, 2002; Robertson *et al.*, 2000; Robertson & Fink, 1998). Die beiden Transkriptionsfaktoren Tpk1 und Tpk3 hingegen wirken meist als Repressoren, die durch eine Feedback-Inhibition der PKA-Aktivierung diesen Prozess inhibieren (Pan & Heitman, 1999; Robertson & Fink, 1998). Die

Tatsache, dass die PKA auch das filamentöse Wachstum stimuliert, kann hier etwas verwundern, da das filamentöse haploid invasive Wachstum unter Glucosemangel durch den Glucose-Repressionsweg präferiert stimuliert wird, die PKA-Aktivität aber meist mit hohen Glucosekonzentrationen verbunden ist. So ist offensichtlich, dass Modelle von Signalwegen sehr vereinfachend dargestellt sind und nicht als einzelne unabhängige Einheiten betrachtet werden dürfen, sondern als Systeme, die kooperativ die Adhäsion kontrollieren.

### 1.5.3 MAPK-Signalkaskade des filamentösen Wachstums

Außer den cAMP-Signalweg stimuliert Ras2 auch die MAPK-Signalkaskade des filamentösen Wachstums (Abbildung 7). Diese Verbindung wird über ein zweites kleines GTP bindendes Protein, Cdc42, geschlossen (Mösch *et al.*, 1996). Beide GTPasen werden sowohl für das diploide Pseudohyphenwachstum als auch das haploid invasive Wachstum benötigt (Mösch *et al.*, 2001; Mösch *et al.*, 1999; Mösch *et al.*, 1996). Das Signal und der Weg der Signaltransduktion für die Aktivierung von Ras2 sind nicht genau bekannt. Es wird angenommen, dass eine Verschlechterung des Nährstoffangebots, insbesondere eine Limitierung von Glucose, eine Rolle spielt (Cullen & Sprague, 2000). Cdc42 interagiert mit der PAK (P21-aktivierte Kinase) Ste20 (MAPKKKK; Mitogen-aktivierbare Protein Kinase) und aktiviert sie unter Mitwirkung zweier paraloger 14-3-3 Proteine, Bmh1 und Bmh2, die für das filamentöse Wachstum essentiell sind (Roberts *et al.*, 1997). Die MAPK-Kinase-Kaskade, bestehend aus Ste20 (MAPKKKK), Ste11 (MAPKKK), Ste7 (MAPKK) und Kss1 (MAPK), wird dann sequenziell durch Phosphorylierung aktiviert. Funktion dieser Kaskade ist die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Ste12. In Abwesenheit von extrazellulären Stimuli für die Adhäsion bindet unphosphoryliertes Kss1 den Transkriptionsfaktor Ste12 und die Proteine Dig1 und Dig2 zu einem inhibitorischen Komplex. Die Phosphorylierung von Kss1 führt zu einer Auflösung dieses Komplexes und der Aktivierung von Ste12 (Bardwell *et al.*, 1998; Cook *et al.*, 1996; Hung *et al.*, 1997). Zur Aktivierung seiner Zielgene wirkt Ste12 zusammen mit Tec1. Tec1 ist ein Transkriptionsfaktor der TEA/ATTS-DNA-Bindedomänenfamilie und wird für das diploide Pseudohyphenwachstum und das haploid invasive Wachstum benötigt (Bürglin, 1991; Gavrias *et al.*, 1996; Mösch & Fink, 1997). Durch die Freisetzung von Ste12 kann dann die PRE (Pheromone Response Element) vermittelte Transkription im

Promotor von *Tec1* aktiviert werden. Außerdem wird die autoregulative Expression von *Tec1* über TCS-Elemente (*Tec1* Consensus-Sequence) verstärkt (Madhani & Fink, 1997). Weitere Zielgene werden dann entweder auch über TCS-Elemente oder von *Tec1* und *Ste12* gemeinsam, wie im Falle von *FLO11*, über FRE-Elemente (Filamentous Response Elements) aktiviert und leiten so das adhäsive Wachstum ein (Köhler *et al.*, 2002; Lo & Dranginis, 1998; Madhani & Fink, 1997).

#### 1.5.4 Generelle-Aminosäure-Kontrolle-Signalweg

Das adhäsive Wachstum wird ebenfalls durch den Generelle-Aminosäure-Kontrolle-Signalweg reguliert. Unter Aminosäuremangelbedingungen wird in haploiden wie diploiden Hefezellen in Gegenwart von Glucose und Ammonium, die normalerweise als Inhibitoren des adhäsiven Wachstum wirken, die *FLO11*-Expression und die Adhäsion induziert (Braus *et al.*, 2003) (Abbildung 7). Bereits das Fehlen einer Aminosäure oder ein Aminosäureungleichgewicht führt zur Aktivierung des Netzwerks der Generelle-Aminosäure-Kontrolle (Hinnebusch, 1992). Die aminosäureabhängige Adhäsion erfolgt unabhängig von der MAPK-Signalkaskade des filamentösen Wachstums. Sie setzt sich aus Elementen des Ras2-/cAMP-Signalwegs und zwei Elementen, *Gcn2* (Dever & Hinnebusch, 2005) und *Gcn4* (Hinnebusch & Natarajan, 2002), des Generelle-Aminosäure-Kontrolle-Signalwegs zusammen. Unter AA-Mangelbedingungen erhöht sich die Zahl ungeladener t-RNAs. Dies wird von der Sensorkinase *Gcn2* wahrgenommen, die wiederum den Translationsinitiationsfaktor eIF2 phosphoryliert, was letztlich in der Derepression von *GCN4* resultiert (Hinnebusch, 1997). *Gcn4* kontrolliert als Transkriptionsfaktor neben einer großen Zahl anderer Gene auch die *FLO11*-Expression und ist so nicht nur für die Adhäsion unter AA-Mangelbedingungen, sondern auch für das haploid invasive und diploide Pseudohyphenwachstum wichtig (Braus *et al.*, 2003; Natarajan *et al.*, 2001).

#### 1.5.5 Weitere *FLO11*-Regulatoren und regulatorische Systeme

Ein weiterer wichtiger Regulationsfaktor von *FLO11* ist, wie durch epistatische Analysen gezeigt werden konnte, der Transkriptionsfaktor *Mss11*. Nach einem aktuellen Modell ist *Mss11* sowohl zu den Transkriptionsaktivatoren *Ste12*, *Tec1* und

Flo8 als auch zu den Transkriptionsrepressoren Nrg1, Nrg2 und Sfl1 epistatisch und nimmt so Einfluss auf die *FLO11*-Regulation durch die beschriebenen Signalwege, mit Ausnahme des Generelle-Aminosäure-Kontrolle-Signalwegs (van Dyk *et al.*, 2005). Wie Mss11 diese Aufgabe erfüllt, ist bisher noch ungeklärt.

Neben den bereits beschriebenen Signalwegen und ihren jeweiligen Transkriptionsfaktoren gibt es zahlreiche weitere Regulatoren, die ebenfalls Einfluss auf die *FLO11*-Expression nehmen. Der Transkriptionsfaktor Sok2 reguliert die Expression von *FLO11* und die Adhäsion negativ: er reprimiert die Expression von *ASH1* und *PHD1*, deren Genprodukte die Transkription von *FLO11* aktivieren (Gimeno & Fink, 1994; Pan & Heitman, 2000; Ward *et al.*, 1995). In Abhängigkeit seines Phosphorylierungszustandes, bestimmt durch die PKA, kann Sok2 als Transkriptionsrepressor oder -aktivator dienen (Shenhar & Kassir, 2001). Die Überexpression der potentiellen Chromatin-Remodeling-Faktoren *MSN1* und *RME1* aktiviert die *FLO11*-Expression (Gagiano *et al.*, 1999a; Sidorova & Breeden, 1999; van Dyk *et al.*, 2003).

Eine besondere Regulationsform von *FLO11* ist die epigenetische Regulation. Innerhalb einer homogenen *S. cerevisiae*-Kultur, in der Zellen *FLO11* exprimieren, kommen immer auch Zellen vor, in denen *FLO11* transkriptionell stillgelegt ist. Für den Prozess der Gen-Stillegung, auch Gen-Silencing genannt, rekrutiert der Transkriptionsrepressor Sfl1, der für die *FLO11*-Promotorspezifität benötigt wird, die Histondeacetylase Hda1. Hda1 ist wahrscheinlich die katalytische Untereinheit des Histon-Deacetylase-Komplexes, unter dessen Aktivität es zur Ausbildung einer transkriptionell inaktiven Heterochromatinstruktur kommt, die metastabil ist und von der Mutter- auf die Tochterzelle vererbt wird (Halme *et al.*, 2004; Verstrepen & Klis, 2006). So findet quasi eine „Voranpassung“ an sich schnell ändernde Umweltbedingungen statt (Kussell & Leibler, 2005). Durch epigenetische Regulation entsteht außerdem ein Gleichgewicht zwischen adhäsiven, koloniebildenden und freischwimmenden Zellen, die neue Nischen besiedeln können.

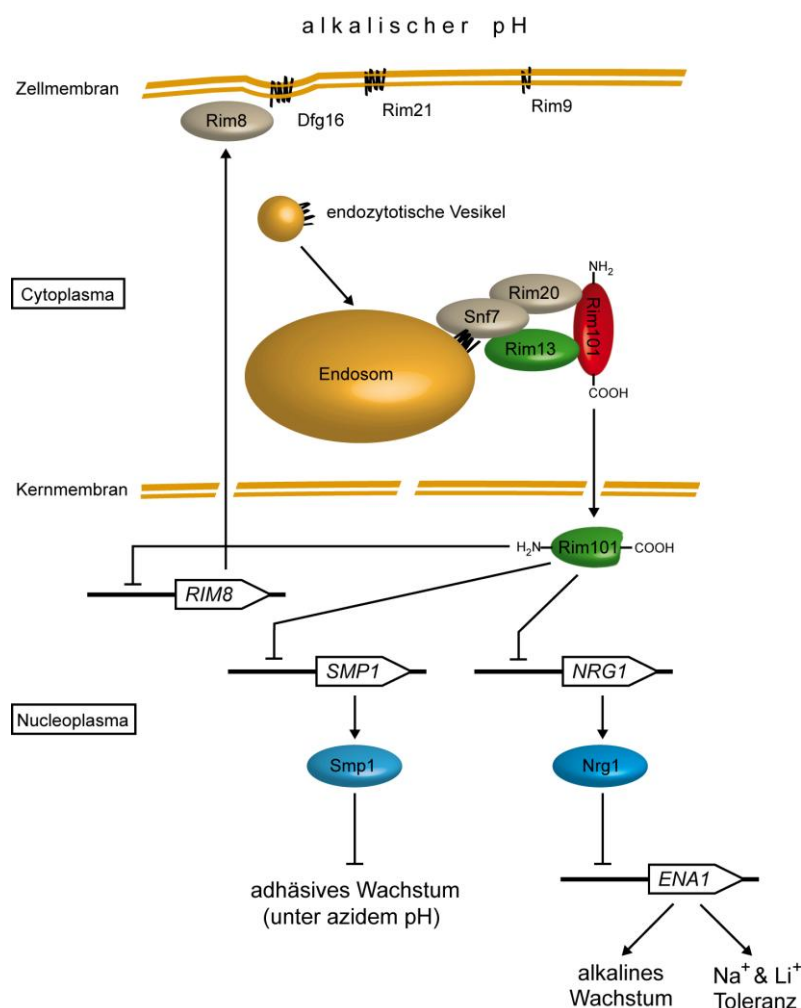
## 1.6 Einfluss von pH auf Rim101-regulierte Prozesse in *S. cerevisiae*

Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* besitzt einen weiteren Faktor, der für die Zelladhäsion essentiell ist. Rim101, der zentrale Transkriptionsrepressor des Rim101-Signalwegs, wurde zuerst als positiver Regulator von Meiose und Sporulation (Su & Mitchell, 1993a; Su & Mitchell, 1993b) sowie des haploid adhäsiven Wachstums beschrieben. So führt eine Deletion von *RIM101* zu einem Verlust der adhäsiven Eigenschaften (Li & Mitchell, 1997). Erst später erkannte man auch hier Auswirkungen auf die pH-Antwort und die Na<sup>+</sup>/Li<sup>+</sup>-Toleranz (Lamb & Mitchell, 2003; Lamb *et al.*, 2001). In *S. cerevisiae* ist die genaue Regulation des Rim101-Signalwegs und sein Effekt auf die Adhäsion unter alkalischen Bedingungen jedoch wenig untersucht.

Für *S. cerevisiae* ist bisher kein eindeutiger pH-Sensor bekannt. Man vermutet, dass die Transmembranproteine Dfg16 (Defective for Filamentous Growth) und Rim21 eine solche Funktion übernehmen könnten (Barwell *et al.*, 2005; Peñalva & Arst, 2002; Rothfels *et al.*, 2005) (Abbildung 8). Eine *dfg16*-Deletion führt zu einem Verlust des diploid adhäsiven und pseudohyphalen Wachstums unter Stickstoffmangelbedingungen (Mösch & Fink, 1997). Ein Modell geht davon aus, dass Dfg16 die Interaktion von Rim20 mit Snf7 und anderen ESCRT- (Endosomal-Sorting Complexes Required for Transport) Untereinheiten des core-ESCRT-Komplexes unterstützt, die eine doppelte Funktion übernehmen und so bei der Bildung von MVB (Multivesicular Bodies) und der Rim101-Prozessierung beteiligt sind (Bowers *et al.*, 2004; Kullas *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2004). Außer den beiden Transmembranproteinen Dfg16 und Rim21 gibt es ein weiteres Transmembranprotein Rim9, dessen Funktion in *S. cerevisiae* bisher unbekannt, aber für den Rim101-Signalweg essentiell ist: eine *rim9*-Deletionsmutante führt in *S. cerevisiae* zu einem gänzlichen Adhäsionsverlust (Li & Mitchell, 1997). Sowohl Rim9 als auch Rim21 weisen eine große Homologie zu PalI und PalH aus *A. nidulans* auf (Tréton *et al.*, 2000) und sind möglicherweise an der pH-Signalweiterleitung beteiligt. So ist für *C. albicans* bekannt, dass *Carim9*- und *Carim21*-Deletionsmutanten einen kompletten Verlust der CaRim101-abhängigen Signalweiterleitung und Hyphenbildung unter alkalischem pH zeigen (Cornet *et al.*, 2009). Rim8 ist ein Ortholog von *A. nidulans* PalF, das zur Familie der Arrestin-ähnlichen Proteine gehört und an der proteolytischen Aktivierung von Rim101 als Antwort auf alkalischen pH beteiligt ist (Li & Mitchell, 1997; Lin *et al.*, 2008). In *A. nidulans* interagiert PalF mit PalH (Homolog zu Rim21 und Dfg16; Tabelle 2) und



wird in Abhängigkeit von alkalischem pH und PalH phosphoryliert und polyubiquitiniert (Herranz *et al.*, 2005; Tréton *et al.*, 2000). Neben seiner aktivierenden Funktion wird Rim8 gleichzeitig von Rim101 über einen Feedback-Loop reguliert, was möglicherweise eine unkontrollierte Anreicherung von aktiviertem Rim101 verhindern soll (Lamb & Mitchell, 2003; Li & Mitchell, 1997).



**Abbildung 8: Der Rim101-Signalweg – Regulation unter alkalischem pH**

Die schematische Darstellung des Rim101-Signalwegs zeigt, dass die beiden Transkriptionsfaktoren Nrg1 und Smp1 (blau) durch Rim101 negativ reguliert werden und Einfluss auf zahlreiche zelluläre Prozesse nehmen. Membranproteine sind schwarz dargestellt, Lipidmembrane in orange, akzessorische und Gerüstproteine in grau. Inaktive Proteine sind rot und ihre aktive Form grün dargestellt. Nähere Erläuterungen erfolgen im Text.

Zwei weitere essentielle Komponenten des Rim101-Signalwegs sind Rim20 und Rim13, deren Interaktion mit Snf7, einem Protein der ESCRT-Untereinheit III, in einem Zwei-Hybrid-Experiment nachgewiesen werden konnte (Ito *et al.*, 2001; Xu & Mitchell, 2001). Ihre Funktion wird noch genauer erläutert. Der ESCRT-Komplex, der u. a. für die Erkennung und Sortierung endozytierter Proteine wichtig ist, besteht aus vier Unter-

einheiten, ESCRT-0, -I, -II und -III, wobei bei der pH-Signalweiterleitung die Untereinheiten I, II und III involviert sind (Xu *et al.*, 2004).

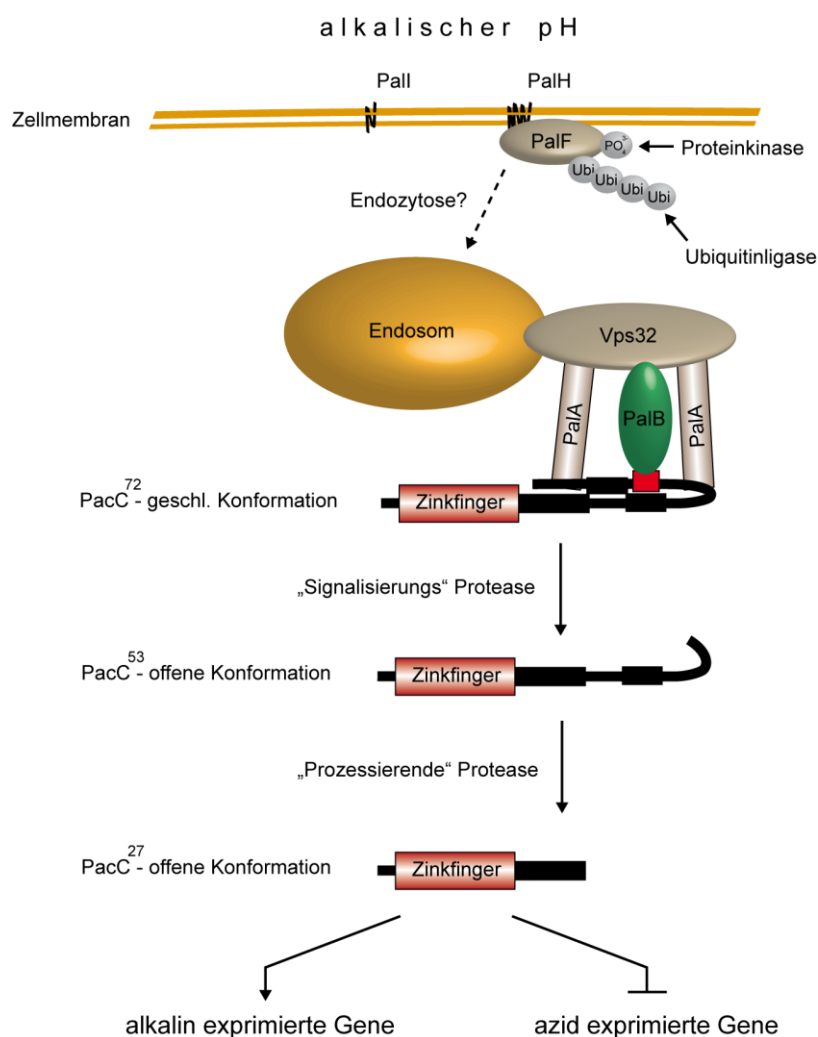
Bisher ergibt sich folgendes Modell für den Rim101-Signalweg: Unter aziden Bedingungen ist Rim8 inaktiv und Dfg16 befindet sich in der Zellmembran an der Zelloberfläche, wo Dfg16 mit Rim9 und Rim21 möglicherweise in einem Komplex vorliegt oder die beiden letzteren an der Biogenese von Dfg16 beteiligt sind (Boysen & Mitchell, 2006). Unter alkalischen pH-Bedingungen (Abbildung 8) könnte der Rim101-Signalweg durch eine Rim8 Modifikation, analog zu der für PalF aus *A. nidulans* beschriebenen, durch Assoziation mit und Endozytose von Dfg16 aktiviert werden, das in endozytotischen Vesikeln zum ESCRT-Komplex an der endosomalen Membran transportiert wird (Barwell *et al.*, 2005; Boysen & Mitchell, 2006). Endosomales Dfg16 stimuliert dann die Interaktion von Rim20, einem *A. nidulans* PalA Homolog, mit Snf7 und anderen ESCRT-Untereinheiten. Durch die Gerüstfunktion des Rim20-Snf7-Komplexes werden Rim101, das durch Rim20 rekrutiert wird und zu *A. nidulans* PacC homolog ist, sowie Rim13, eine Calpain-ähnliche Cystein-Protease, an der Endosomenmembran nahe beieinander lokalisiert (Peñalva & Arst, 2002; Peñalva *et al.*, 2008). Durch die proteolytische Aktivität von Rim13 kommt es zur Prozessierung des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors Rim101, dem zentralen Element des Rim101-Signalwegs, indem etwa 100 AS am C-Terminus von Rim101 durch die Protease abgespalten werden (Li *et al.*, 2004). Die verkürzte Rim101-Version wirkt als Transkriptionsrepressor. Wie die transkriptionelle Repression Rim101-regulierter Gene in *S. cerevisiae* geschieht, ist bisher ungeklärt. Es konnte jedoch für *S. cerevisiae*, wie auch *C. albicans* gezeigt werden, dass Rim101 mit der Zinkfinger-DNA-Bindedomäne unabhängig vom Grad seiner Prozessierung an Promotoren bindet (Baek *et al.*, 2006; Lamb & Mitchell, 2003). Es wird eine Interaktion mit weiteren Repressoren über den durch die Prozessierung exponierten Bereich vermutet (Rothfels *et al.*, 2005). Als ein bekanntes Rim101-Bindemotiv wird bisher das Rim101 homologe PacC Bindemotiv 5'-TGCCAAG-3' aus *A. nidulans* beschrieben, das in den Promotorregionen vieler hochregulierter Gene in einer *rim101*-Deletionsmutante nachgewiesen werden kann (Mira *et al.*, 2009). Die Rim101-Homologe in *C. albicans* und *N. nidulans*, CaRim101 und PacC, können als Transkriptionsaktivatoren dienen, während Rim101 als Transkriptionsrepressor bekannt ist (Peñalva & Arst, 2002). Wie durch ChIP-(Chromatin-Immunopräzipitation) Versuche herausgefunden wurde, assoziiert Rim101

u. a. mit Promotorregionen von *NRG1*, *SMP1* und *RIM8* und reprimiert diese (Lamb & Mitchell, 2003). Nrg1 ist als negativer Regulator des durch Flo11-vermittelten invasiven Wachstums bekannt, der unter niedrig-Glucose-Bedingungen durch Snf1, der zentralen Komponente des Glucose-Repressions-Signalwegs, inhibiert wird (Kuchin *et al.*, 2003). Während der nicht adhäsive Phänotyp einer *rim101*-Deletionsmutation im SK1-Stammhintergrund (meist für die Untersuchung von Sporulation und Meiose verwendet) in einer *rim101Δ smp1Δ*-Doppelmutante unter aziden pH-Bedingungen supprimiert wird, konnte dies für eine *rim101Δ nrg1Δ*-Doppelmutante nicht gezeigt werden. Weitere durch Nrg1 reprimierte Gene sind die unter alkalischen Bedingungen induzierten Gene *ZPS1* und *ENAI* (Lamb & Mitchell, 2003). Ena1, eine P-Typ ATPase Natrium-Pumpe, wird für das Wachstum unter alkalischen Bedingungen benötigt und realisiert eine Na<sup>+</sup>- und Li<sup>+</sup>-Toleranz (Haro *et al.*, 1991; Lamb *et al.*, 2001; Ruiz & Ariño, 2007; Tenney & Glover, 1999). Nrg1 und Rim101 sind außerdem beide als Co-Repressoren von *DIT1* bekannt, einem sporulationsspezifischen Gen, das für die Sporenwandreifung wichtig ist. Sie reprimieren es über ein so genanntes NRE (Negative Response Element) (Rothfels *et al.*, 2005). Rim101 hat einen Einfluss auf zahlreiche weitere Gene: so wird *VMA4*, das für eine vakuoläre H<sup>+</sup>-ATPase Untereinheit kodiert und für das Wachstum unter alkalischem pH benötigt wird, ebenso positiv von Rim101 reguliert, wie *ARN4*, das für einen bakteriellen Siderophoren-Eisen-Transporter kodiert und *FET4*, einen niedrig-affinen Fe(II)-Transporter (Lamb & Mitchell, 2003; Lamb *et al.*, 2001).

## 1.7 pH-Regulation in Pilzen durch Homologe von Rim101

Die Anpassung an einen weiten pH-Bereich erfordert neben einem internen pH-Homeostasissystem auch die Fähigkeit der Synthese von Permeasen, sezernierten Enzymen und exportierten Metaboliten in pH-Bereichen, in denen sie funktionell sind. So ist Rim101 nicht nur in *S. cerevisiae* vorhanden, sondern im Reich der Pilze sowohl in Asco- als auch Basidiomyceten hoch konserviert. Der Rim101-Signalweg wurde in einigen human- und phytopathogenen Pilzen näher untersucht. So ist in *A. nidulans* der homologe PacC-Signalweg für die Anpassung an azide und alkalische Bedingungen bekannt. Die regulatorische Funktion einiger Komponenten dieses Signalwegs wurde bereits vor 25 Jahren erstmalig erwähnt (Caddick *et al.*, 1986). Ein weiterer

humanpathogener Pilz, an dem der Rim101-Signalweg untersucht wird, ist *C. albicans*. Hier spielt er vor allem bei der Pathogenität und dem Wachstum unter alkalischen Bedingungen eine wichtige Rolle (Davis, 2009). Der phytopathogene Basidiomycet *U. maydis* kodiert ebenfalls für ein Rim101/PacC-Homolog, das in zahlreiche pH-sensitive Regulationen involviert ist (Arechiga-Carvajal & Ruiz-Herrera, 2005).



**Abbildung 9: Modell der zweistufigen PacC-Prozessierung in *A. nidulans***

Modell der PacC-Prozessierung in *A. nidulans* nach (Peñas *et al.*, 2007). Nähere Erläuterungen erfolgen im Text.

In *A. nidulans* sind bisher sieben Gene des PacC-Signalwegs bekannt, die an der pH-Regulation beteiligt sind (Tabelle 2). PacC als zentrale Komponente dieses Signalwegs liegt unter aziden Bedingungen hauptsächlich in seiner 72 kDa-Volllängenform vor. Unter neutralen-alkalischen Bedingungen wird PacC im Gegensatz zu *S. cerevisiae* Rim101 zweistufig proteolytisch verkürzt (Abbildung 9) (Diez *et al.*, 2002; Mingot *et al.*, 1999; Orejas *et al.*, 1995). Die erste, auch als Signal-proteolytische-Verkürzung

bezeichnete Prozessierung erfolgt unter alkalischem pH in der hoch konservierten „Signalling-Protease-Box“ zu einer 53 kDa großen PacC-Form mit geschlossener Konformation. Dieser Verkürzungsschritt entspricht dem in *S. cerevisiae* bekannten Rim101-Prozessierungsschritt (Lamb *et al.*, 2001; Li & Mitchell, 1997). Der zweite Prozessierungsschritt der offenen PacC<sup>53</sup>-Konformation wird durch das Proteasom zu PacC<sup>27</sup> katalysiert und findet unter aziden Bedingungen nicht statt, da PacC<sup>72</sup> in einer geschlossenen Konformation vorliegt, die für das Proteasom nicht zugänglich ist (Hervás-Aguilar *et al.*, 2007). Die verkürzte PacC<sup>27</sup>-Form ist gleichzeitig Aktivator von Genen, die unter alkalischen Bedingungen exprimiert werden (Espeso & Peñalva, 1996), und reprimiert unter aziden Bedingungen exprimierte Gene (Diez *et al.*, 2002; Espeso & Arst, 2000; Espeso & Peñalva, 1996; Mingot *et al.*, 1999; Orejas *et al.*, 1995).

**Tabelle 2: Homologe Komponenten des Rim101-/PacC-Signalwegs aus *S. cerevisiae* und *A. nidulans***

| Funktion   | <i>S. cerevisiae</i> | <i>A. nidulans</i> |  |
|--|----------------------|--------------------|--|
| Membranprot./ pot. alkalischer pH-Sensor           | Dfg16                | PalH               | Barwell <i>et al.</i> , 2005                         |
| Rim101-Aktivierung                                 | Rim8                 | PalF               | Tréton <i>et al.</i> , 2000                          |
| pot. Membranprot./ Rim101-Aktivierung              | Rim9                 | PalI               | Denison <i>et al.</i> , 1998                         |
| ESCRT III - Untereinheit                           | Rim21                | PalH               | Tréton <i>et al.</i> , 2000                          |
| ESCRT III - Untereinheit                           | Snf7                 |                    |  |
| Calpain ähnl. Cystein-Protease / aktiviert Rim101  | Rim13                | PalB               | Penalva und Arst, 2002<br>Futai <i>et al.</i> , 1999 |
| involv. in Rim101-Aktiv. / Snf7-Rim101-Interaktion | Rim20                | PalA               | Xu and Mitchell, 2001                                |
| Transkriptionsfaktor / pH-Antwort                  | Rim101               | PacC               | Tilburn <i>et al.</i> , 1995                         |

Die pH-Signalweiterleitung erfolgt in *A. nidulans* durch einen Plasmamembrankomplex aus PalH (*S. cerevisiae* Dfg16 u. Rim21) und dem Arrestin-ähnlichen PalF (*S. cerevisiae* Rim8), wobei wahrscheinlich auch PalI (*S. cerevisiae* Rim9) an diesem Komplex beteiligt ist. PalF bindet an den cytoplasmatischen Teil von PalH und wird unter alkalischem pH phosphoryliert und ubiquitiniert, was möglicherweise zur Endozytose des PalF-PalH-Komplexes führt und so die pH-Signalweiterleitung zu den unterhalb lokalisierten Signalwegs-Komponenten ermöglicht (Abbildung 9) (Calcagno-Pizarelli *et al.*, 2007; Denison *et al.*, 1998; Herranz *et al.*, 2005; Li & Mitchell, 1997). Die weitere pH-Signalweiterleitung erfolgt über ein Modul, das mit dem ESCRT-Komplex und den endosomalen Membranen assoziiert ist und hauptsächlich auf einem Modell aus Untersuchungen in *S. cerevisiae* beruht (Xu *et al.*, 2004) (Kapitel 1.6). Der erste PacC-Prozessierungsschritt gleicht deshalb auch dem in Kapitel 1.6 für *S. cerevisiae* beschriebenen. PalA (*S. cerevisiae* Rim20) verbindet PacC<sup>72</sup> mit Vps32

(*S. cerevisiae* Snf7) des ESCRT-III Komplexes. In Analogie zu dem Modell in *S. cerevisiae* geht man davon aus, dass PalB, für dessen *S. cerevisiae*-Homolog Rim13 eine Interaktion mit Snf7 nachgewiesen werden konnte (Ito *et al.*, 2001), zusammen mit Vps32, PalA, PalB und PacC an der endosomalen Membran einen Komplex bildet, der für den ersten PacC Proteolyseschritt durch PalB zur offenen PacC<sup>53</sup>-Form benötigt wird (Abbildung 9) (Arst & Peñalva, 2003; Diez *et al.*, 2002; Peñalva & Arst, 2004; Peñalva & Arst, 2002; Peñalva *et al.*, 2008). Die PacC-vermittelte pH-Antwort ist bei der Pathogenität von entscheidender Bedeutung. So wird die Ausbildung der pulmonalen Aspergillose in neutropenischen Mäusen entscheidend durch eine Deletion von PacC, die Blockierung des pH-Signaltransduktionswegs oder die Unterbindung der proteolytischen PacC-Prozessierung geschwächt, was zu limitiertem *in vivo* Wachstum und reduzierter inflammatorischer Zell-Infiltration des Pilzes führt. Bei konstitutiver PacC Expression nimmt die Mortalität und das invasive Pilzwachstum hingegen zu (Bignell *et al.*, 2005).

*C. albicans* kommt sowohl als humaner Kommensale der Schleimhäute als auch als opportunistisch pathogener Organismus vor, wobei er gezwungen ist, sich an extreme Umweltbedingungen von pH 2-10 anzupassen, wie beispielsweise dem sehr niedrigen pH des Verdauungstraktes (Odds, 1988). Die Anpassung an neutralen-alkalischen pH wird dabei teilweise vom CaRim101-Signalweg realisiert, der auch den pH-induzierten Dimorphismus reguliert. Unter aziden pH-Bedingungen wächst der Pilz in der Hefezellform, wobei unter alkalischen Bedingungen die hyphale Wachstumsform überwiegt (Davis, 2003; Konno *et al.*, 2006). Das Modell der CaRim101-Aktivierung in *C. albicans* wird analog zu dem aus *S. cerevisiae* bekannten beschrieben (Davis, 2009). Neben der unter alkalischen Bedingungen induzierten Filamentbildung und dem Wachstum unter extremen alkalischen Bedingungen vermittelt der CaRim101-Signalweg in *C. albicans* auch Resistenz gegenüber hohen Lithiumkonzentrationen. Die 85 kDa-Volllängenform von CaRim101 wird pH-abhängig C-terminal durch CaRim13 prozessiert - unter alkalischen Bedingungen zu einer 74 kDa-Form und unter aziden Bedingungen zu einer 65 kDa-Form (Li *et al.*, 2004). Bisher ist allerdings unklar, ob CaRim101<sup>65</sup> direkt aus der Volllängen- oder der CaRim101<sup>74</sup>-Form prozessiert wird und welche Funktion diese verkürzte Form unter aziden pH-Bedingungen erfüllt. Unter alkalischen Bedingungen übt CaRim101 eine spezifische Funktion bei der Gewebeinvasion in Schleimhäute aus, indem es die Protease CaSap5 vermittelte E-

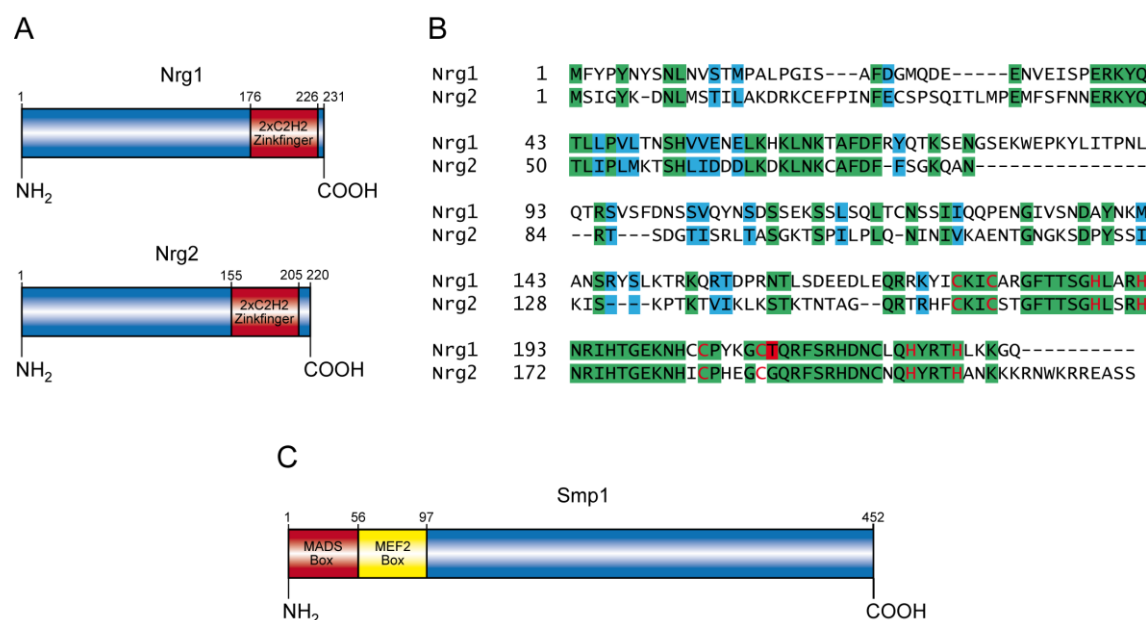
Cadherin-Degradation positiv reguliert (Villar *et al.*, 2007). Die CaRim101-abhängige Expression des Agglutinin-ähnlichen Adhäsins *CaALS3* erlaubt die Bindung an Wirtszell-Cadherin, was die Wirtszellinvasion ermöglicht (Nobile *et al.*, 2008). Außerdem unterstützt CaRim101 unter diesen Bedingungen die Eisen-Aufnahme durch Induktion der beiden  $\text{Fe}^{3+}$ -Reduktasen *CaFRE2* und *CaFRP1* (Baek *et al.*, 2008).

Ein Rim101-Homolog kann auch in dem Basidiomyceten *U. maydis* nachgewiesen werden, das die größte Homologie zu PacC-Proteinen aus *Fusarium oxysporum* und *Aspergillus niger* aufweist. Eine *rim101*-Deletion führt in *U. maydis* wie auch den beschriebenen Ascomyceten zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Li}^+$ -Ionen und weiteren pleiothrophischen Veränderungen. So sind mutierte Hefezellen verlängert und unter aziden Bedingungen für Wildtypzellen eher ungewöhnlich oft septiert, was für eine Rim101-abhängige Beeinflussung des Zellzyklus spricht. Eine veränderte Virulenz von *rim101*-Deletionsmutanten konnte gegenüber dem Wildtypstamm jedoch nicht nachgewiesen werden. Auch das Zellwachstum und der Dimorphismus wurden unter azidem und neutralem pH bei *RIM101*-Abwesenheit nicht beeinflusst, was darauf hindeutet, dass Rim101 in *U. maydis* für das Wachstum entbehrlich ist (Arechiga-Carvajal & Ruiz-Herrera, 2005).

## 1.8 Die Transkriptionsfaktoren Nrg1, Nrg2 und Smp1

*NRG1* (Negative Regulator of Glucose-repressed genes) wurde in *S. cerevisiae* var. *diastaticus* als negativer Regulator von *STA1*, das für eine sekretierte Amyloglykosidase kodiert und in Anwesenheit von Glucose reprimiert ist, entdeckt (Ahn *et al.*, 1995; Park *et al.*, 1999). *NRG1* kodiert für ein 231 AS langes Protein mit zwei Tandem C2H2-Zinkfinger-DNA-Bindemotiven in der Nähe des C-Terminus (Abbildung 10 A), wobei die DNA-Bindedomäne starke Homologien zu den Bindedomänen der *S. cerevisiae* Transkriptionsfaktoren Mig1 und Msn2, sowie in Säugern zu den frühen Wachstumsregulatoren Egr-1/Zif268/Krox-24 und dem Wilms' Tumor Lokus Protein aufweist (Park *et al.*, 1999). Neben Genen, die bei der Versorgung der Zelle mit Kohlenstoff eine wichtige Rolle spielen (*SUC2*, *GAL1* und *GAL10*) (Zhou & Winston, 2001), werden weitere Gene, unter anderem aus dem Bereich der Stressantwort Nrg1-abhängig reguliert. Hierzu gehören sowohl das bereits in Kapitel 1.6 erwähnte *ENA1*, das für eine  $\text{Na}^+$ -ATPase kodiert, die unter alkalischem pH und Ionenstress exprimiert

wird, als auch *DOG2*, das für eine Phosphatase kodiert, die unter osmotischem und oxidativen Stress exprimiert wird (Platara *et al.*, 2006; Vyas *et al.*, 2001). Weitere durch Nrg1 transkriptionell regulierte Gene sind *DIT1*, das für ein sporulationsspezifisches Enzym kodiert, und das für ein Plasmamembranprotein kodierende Gen *IZH2*, das in die Zink-Homeostasis und die Osmotin induzierte Apoptose involviert ist (Kupchak *et al.*, 2007; Lamb & Mitchell, 2003; Narasimhan *et al.*, 2005; Rothfels *et al.*, 2005). In *C. albicans* führt der Verlust des *S. cerevisiae* Nrg1-Homologs, CaNrg1, zur filamentös-invasiv wachsenden hyphalen Zellform, die im Gegensatz zur hyphalen Wildtyp-Zellform avirulent ist (Murad *et al.*, 2001). Nrg1 und CaNrg1 interagieren *in vivo* mit dem globalen Ssn6-Tup1-Repressorkomplex, der für eine Nrg1- bzw. CaNrg1-abhängige Zielgenrepression essentiell ist (Murad *et al.*, 2001; Park *et al.*, 1999).



**Abbildung 10: Domänenstruktur und Alignment der Transkriptionsrepressoren Nrg1 und Nrg2 bzw. Smp1 aus *S. cerevisiae***

A) Nrg1 und Nrg2 tragen C-terminal eine Zinkfinger-DNA-Bindedomäne mit zwei C2H2-Zinkfingermotiven. (rot)  
B) Alignment der AS-Sequenz (Einbuchstabencode) von Nrg1 und Nrg2 aus dem *S. cerevisiae* S288c-Stammhintergrund. Grüne Boxen markieren identische AS-Reste im Sequenzvergleich, türkise Boxen entsprechen ähnlichen AS-Resten. Der Sequenzvergleich erfolgte mit dem Programm MSA (Gupta *et al.*, 1995; Lipman *et al.*, 1989) in „Biology Workbench v3.2“ (<http://workbench.sdsc.edu>). Die Cysteine und Histidine der vorhergesagten Zinkfinger sind als rote Buchstaben hervorgehoben (Böhm *et al.*, 1997; Park *et al.*, 1999). Der hervorgehobene Threoninrest in Nrg1 an Position 210 (rote Box) ist im *S. cerevisiae* S1278b-Stammhintergrund zu einem Alanin ausgetauscht (Schäfer, 2009). C) Der Transkriptionsrepressor Smp1 trägt N-terminal eine MADS-Box-DNA-Bindedomäne (rot), auf die eine MEF2-Box (gelb) folgt, die bei dem Metazoen Transkriptionsfaktor MEF2 essentiell für die Dimerisierung ist (Dodou & Treisman, 1997). (Zahlen entsprechen der Position der AS-Reste im Protein.)

*NRG1* wird sowohl durch den Rim101-Signalweg als auch den Glucose-Repressions-Signalweg, wie in den Kapiteln 1.6 und 1.5.1 beschrieben wurde, reguliert. Durch Interaktionsstudien mit Snf1, der zentralen Komponente des Glucose-Repressions-



Signalwegs, wurde der zu Nrg1 homologe Transkriptionsfaktor Nrg2 (Abbildung 10 A) entdeckt, wobei beide physisch mit Snf1 interagieren, eine direkte Phosphorylierung durch Snf1 jedoch nicht gezeigt werden konnte (Vyas *et al.*, 2001).

Nrg1 und Nrg2 besitzen innerhalb ihrer Zinkfinger-DNA-Bindedomäne eine Homologie von 84 % zueinander, während der übrige Teil der beiden Proteine nur eine Homologie von 27 % aufweist (Abbildung 10 B). Durch Microarray-Analysen von *nrg1Δ*-, *nrg2Δ*- und *nrg1Δ nrg2Δ*-Stämmen wurden Gene identifiziert, in deren Promotoren sogenannte „Stress Responsive“ (STRE)-ähnliche Sequenzen überrepräsentiert sind (Vyas *et al.*, 2005). Die STRE-ähnlichen Sequenzen ähneln einer Konsensussequenz (5'-CCCCT-3'), die von den Transkriptionsrepressoren der Generellen Stressantwort, Msn2 und Msn4, gebunden werden können (Martinez-Pastor *et al.*, 1996; Schmitt & McEntee, 1996). Für Nrg1 sind mehrere Bindemotive beschrieben worden, die alle Ähnlichkeit zu STRE besitzen. An die Sequenz 5'-AGACCCT-3' im *ENA1*-Promotor kann Nrg1 nicht nur *in vivo*, sondern auch *in vitro* binden (Platara *et al.*, 2006). Ein sehr ähnliches Nrg1-Bindemotiv mit der Sequenz 5'-GGACCCT-3' wurde in einer genomweiten Analyse beschrieben (Harbison *et al.*, 2004). *In vitro* Analysen im zum *FLO11*-Promotor evolutionär sehr nah verwandten *STA1*-Promotor führten zur Entdeckung der Nrg1-Bindemotive 5'-CCCTC-3' und 5'-CCCCT-3' (Gagiano *et al.*, 1999b; Lo & Dranginis, 1996; Park *et al.*, 1999). Für Nrg2 hingegen waren zu Beginn dieser Arbeit noch keine Bindemotive beschrieben.

Der Transkriptionsrepressor Smp1 (Second MEF2-like Protein) (Abbildung 10 C) wird als Regulator des „High Osmolarity Glycerol“ (HOG)-Signalwegs beschrieben, der von der Hog1 MAP-Kinase unter osmotischen Stressbedingungen phosphoryliert wird und zur Expression stressinduzierter Gene führt, die für osmoprotektive Proteine kodieren (de Nadal *et al.*, 2003). Entdeckt wurde *SMP1* aufgrund seiner Sequenzähnlichkeit zu dem Metazoen-Transkriptionsfaktor MEF2 und dem *S. cerevisiae* Transkriptionsfaktor Rlm1. Sowohl Smp1 als auch Rlm1 besitzen N-terminal eine MADS-Box-DNA-Bindedomäne, wobei MADS ein Akronym für die Gene *MCMI*, *ARG80*, *DEFICIENS* (TF der Organogenese in *Antirrhinum coulterianum*) und *SRF* (human Serum Response Factor) ist. Obwohl die genannten Gene alle für Transkriptionsfaktoren kodieren und eine konservierte DNA-Bindedomäne besitzen, sind sie funktionell verschieden (Shore & Sharrocks, 1995). C-terminal schließt sich an die MADS-Box eine MEF2-Box an, über die Smp1 Homodimere sowie Heterodimere mit Rlm1 bilden kann (Dodou &

Treisman, 1997). MADS-Box-Proteine besitzen die Fähigkeit, mit zahlreichen akzessorischen Proteinen zu interagieren (Krüger *et al.*, 1997), wodurch z. B. die beiden Gene *STL1* und *CWP1* unterschiedlich durch Smp1 reguliert werden können. Die genannten Gene tragen beide Smp1-Bindemotive in ihren Promotoren, die der einzigen bekannten Smp1-Konsensussequenz 5'-ACTACTA(A/T)<sub>4</sub>TAG-3' ähneln (Dodou & Treisman, 1997). Während Smp1 die Expression des Protonen-Symporters *STL1* aktiviert (de Nadal *et al.*, 2003), wird die Expression des für ein Zellwandprotein kodierenden *CWP1* in einer *rim101*-Deletionsmutante durch eine erhöhte Smp1-Proteinmenge reprimiert (Lamb & Mitchell, 2003).

## 1.9 Ziele dieser Arbeit

Das Hauptziel dieser Arbeit war es, die Kontrolle der *FLO11*-abhängigen Adhäsion durch pH und den Rim101-Signalweg in *S. cerevisiae* zu untersuchen.

Spezifisch wurden folgende Ziele verfolgt:

1. Die Regulation von *FLO11* durch den Rim101-Signalweg sollte im Detail untersucht werden, wobei insbesondere die beteiligten Transkriptionsfaktoren, sowie deren Bindestellen im *FLO11*-Promotor identifiziert werden sollten.
2. Die Kontrolle von Flo11 und der Zell-Oberflächenadhäsion durch den pH-Wert sollte geklärt werden.
3. Der Effekt des pH-Wertes auf die globale Genexpression sollte im adhäsiven  $\Sigma 1278b$ -Stamm gemessen werden, sowie die Rolle des Rim101-Signalwegs bestimmt werden.

## 2 Ergebnisse

### 2.1 Kontrolle der *FLO11*-abhängigen Adhäsion durch den Rim101-Signalweg

Viele zelluläre Antworten in *Saccharomyces cerevisiae* werden durch den hoch konservierten Rim101-Signalweg und dessen zentralen Transkriptionsfaktor Rim101 vermittelt. Untersuchungen im SK1-Stammhintergrund zeigten neben der positiven Regulation von Meiose und Sporulation (Su & Mitchell, 1993a; Su & Mitchell, 1993b) unter alkalischen Bedingungen auch eine Abhängigkeit des Wachstums von diesem Signalweg (Lamb & Mitchell, 2003; Lamb *et al.*, 2001).

Eine Deletion des Gens, das für den Transkriptionsfaktor Rim101 kodiert, führt im SK-1-Hintergrund zu einem Verlust des adhäsiven/invasiven Wachstums in saurem pH-Milieu (Lamb & Mitchell, 2003; Li & Mitchell, 1997). Da es Ziel dieser Arbeit war, den Rim101-Signalweg im  $\Sigma$ 1278b-Hintergrund näher zu charakterisieren, wurde zunächst die Bedeutung von *RIM101* für die Regulation der Adhäsion untersucht.

#### 2.1.1 Einfluss von *RIM101* auf die *FLO11*-Expression und die Adhäsion

Hefezellen besitzen durch das Zelloberflächenglykoprotein Flo11 die Fähigkeit, einen Kontakt zu Agar und Plastik herzustellen. Diese adhären Zellen können durch Waschen nicht mehr von der Agaroberfläche entfernt werden (Roberts & Fink, 1994). *FLO11* gehört zur Familie der Flokkulingene und wird für das haploid adhäsive/invasive Wachstum und das diploide Pseudohyphenwachstum benötigt (Lambrechts *et al.*, 1996; Lo & Dranginis, 1998), wobei die genaue Interaktion zwischen Zelle und Oberfläche beim adhäsiven Wachstum unklar ist (Guo *et al.*, 2000; Lo & Dranginis, 1998).

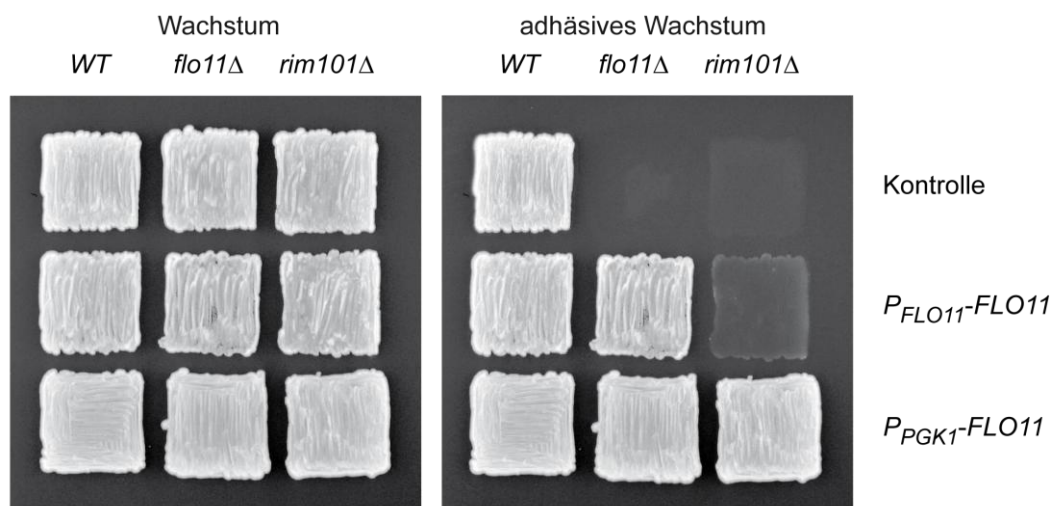
Es wurde überprüft, ob der Adhäsionsverlust einer *rim101*-Deletionsmutante im  $\Sigma$ 1278b-Stammhintergrund direkt über den *FLO11*-Promotor reguliert ist. Hierzu wurde zunächst eine Northern-Analyse durchgeführt, die bestätigte, dass der Adhäsionsverlust einer *flo11*- und *rim101*-Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtypstamm mit einem drastischen *FLO11*-Transkriptverlust einhergeht (Abbildung 11).



**Abbildung 11: *RIM101*-abhängige Regulation des Flokkulins *FLO11***

Transkript-Analyse: Die Stämme wurden in YNB bis zu einer  $OD_{600} = 0,7$  inkubiert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA der für 3 h in YNB-Medium (pH 4,5; 25 mM HEPES gepuffert) weiterinkubierten *S. cerevisiae*-Stämme isoliert. Die Transkriptmengen von *FLO11* und *ACT1* wurden durch eine Northern-Analyse bestimmt und es wurde für die Quantifizierung das Verhältnis zu *ACT1* ermittelt. Als Bezugsgröße diente der WT-Stamm. Angaben sind in Prozent. Verwendete Stämme: WT (YHUM0909), *flo11Δ* (YHUM0924) und *rim101Δ* (YHUM1461), jeweils transformiert mit dem Plasmid B2445 (*CEN*, *URA3*).

Für die weitere Analyse wurde ein Agar-Waschtest verwendet. Hierfür wurde in einen Wildtypstamm und eine *flo11*- bzw. *rim101*-Deletionsmutante jeweils eines von zwei *CEN*-Plasmiden transformiert, das *FLO11* entweder von seinem nativen Promotor aus exprimiert oder es von seiner regulären Kontrolle durch einen *PGK1*-Promotor entkoppelte. Als Kontrolle diente ein Leervektor. Die verwendeten Stämme wurden auf SC-Platten (pH 5,5) ausgestrichen und nach 3 Tagen einem Waschtest unterzogen.



**Abbildung 12: In saurem Milieu wird die *Rim101*-abhängige Adhäsion über den *FLO11*-Promotor reguliert.**

Die Stämme wurden für 3 Tage auf SC-Platten (pH 5,5) inkubiert und vor (Wachstum) und nach (adhäsives Wachstum) einer Waschprozedur fotografiert. Dabei stellte sich heraus, dass die *FLO11*-Expression in einer *rim101Δ*-Mutante promotorabhängig reguliert wird. Verwendete Stämme: WT (YHUM0909), *flo11Δ* (YHUM0924) und *rim101Δ* (YHUM1461) jeweils transformiert mit den Plasmiden B2445 (*CEN*, *URA3*), BHUM0778 ( $P_{FLO11}$ -*FLO11*- $T_{FLO11}$ , *CEN*, *URA3*) und BHUM1574 ( $P_{PGK1}$ -*FLO11*- $T_{FLO11}$ , *CEN*, *URA3*).

Wie durch den Agaradhäsionstest in Abbildung 12 gezeigt werden konnte, findet in azidem Milieu eine *RIM101*-abhängige Kontrolle der *FLO11*-Expression über den

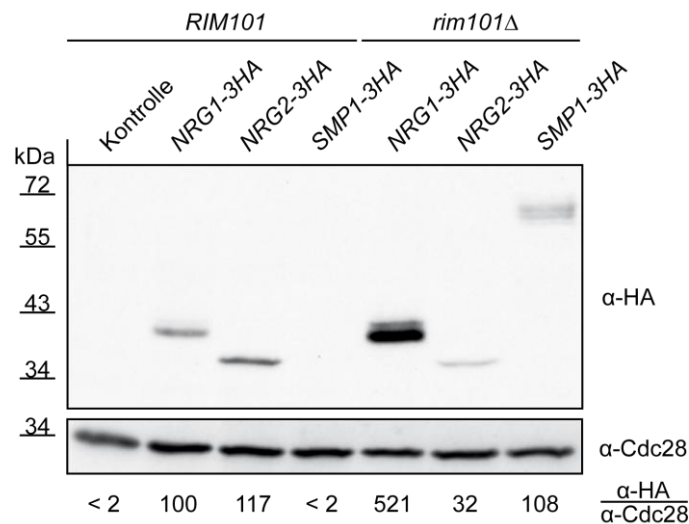
*FLO11*-Promotor statt. Der *rim101*-Deletionsstamm, der zusätzlich zu dem endogen vorhandenen *FLO11* eine weitere Kopie auf einem *CEN*-Plasmid trug, war wie der *rim101Δ*-Kontrollstamm nicht adhäsiv. Die *FLO11*-Repression in einer *rim101Δ*-Mutante konnte erst durch die Verwendung eines *CEN*-Plasmids entkoppelt werden, das *FLO11* von einem *PGK1*-Promotor aus exprimiert und so zu einem adhäsiven Phänotyp führte. Der nicht adhäsive *flo11Δ*-Phänotyp konnte durch eine zusätzliche *FLO11*-Kopie auf einem *CEN*-Plasmid komplementiert werden.

### 2.1.2 *RIM101* reguliert *FLO11* abhängig von *NRG1*, *NRG2* und *SMP1*

Rim101 ist in *S. cerevisiae* als Transkriptionsrepressor bekannt (Peñalva & Arst, 2002). Durch ChIP-Analysen im SK1-Stammhintergrund konnte gezeigt werden, dass Rim101 im Promotorbereich der für die Transkriptionsrepressoren Nrg1 und Smp1 kodierenden Gene bindet. Eine Mutation des Rim101-Repressionstargets *NRG1* kann die Defekte bezüglich alkalischem Wachstum und Ionentoleranz einer *rim101Δ*-Mutation in einer *rim101Δ nrg1Δ*-Doppelmutante supprimieren, wohingegen sowohl Meiose- und Sporulationsdefekte als auch der Verlust des haploid invasiven Wachstums einer *rim101*-Deletionsmutation durch eine *smp1Δ*-Mutation supprimiert werden (Lamb & Mitchell, 2003). Nrg1 und Nrg2, das in seiner Zinkfinger-DNA-Bindedomäne eine große Homologie zu Nrg1 aufweist, interagieren beide mit der zentralen Kinase Snf1 des Glucoserepressionswegs (Vyas *et al.*, 2001) und reprimieren das Flokkulieren *FLO11*, das Pseudohyphenwachstum und die Biofilmbildung (Kuchin *et al.*, 2002).

Es war deshalb von besonderem Interesse zu analysieren, welchen Einfluss die Abwesenheit von *RIM101* auf die Expression von Nrg1, Nrg2 und Smp1 im  $\Sigma$ 1278b-Hintergrund ausübt. Es wurde hierfür die Proteinmenge der Transkriptionsrepressoren Nrg1, Nrg2 und Smp1 in einem *S. cerevisiae*-Wildtyp- und *rim101Δ*-Stamm durch eine Western-Analyse bestimmt (Abbildung 13). Die Transkriptionsrepressorgene wurden dazu mit einer 3HA-kodierenden Sequenz im 3'-Bereich des Leserahmens getagged (Knop *et al.*, 1999). Der Immunoblot bestätigte, dass die Proteinmenge aller drei Transkriptionsfaktoren *RIM101*-abhängig reguliert ist. Die Nrg1-3HA- und Nrg2-3HA-Menge im Wildtypstamm unterschied sich nicht signifikant, wohingegen die Nrg1-3HA-Menge im *rim101Δ*-Stamm 5-fach zu- und die Menge an Nrg2-3HA 4-fach abnahm. Smp1-3HA war im Wildtypstamm nicht nachweisbar, jedoch im *rim101Δ*-

Stamm etwa vergleichbar stark wie Nrg1-3HA und Nrg2-3HA im Wildtypstamm exprimiert. Diese Erkenntnisse werden durch Ergebnisse im SK1-Stammhintergrund ergänzt, die in einem *rim101*-Deletionsstamm eine Erhöhung der *NRG1*- und *SMP1*-Transkriptmenge bestätigen (Lamb & Mitchell, 2003).



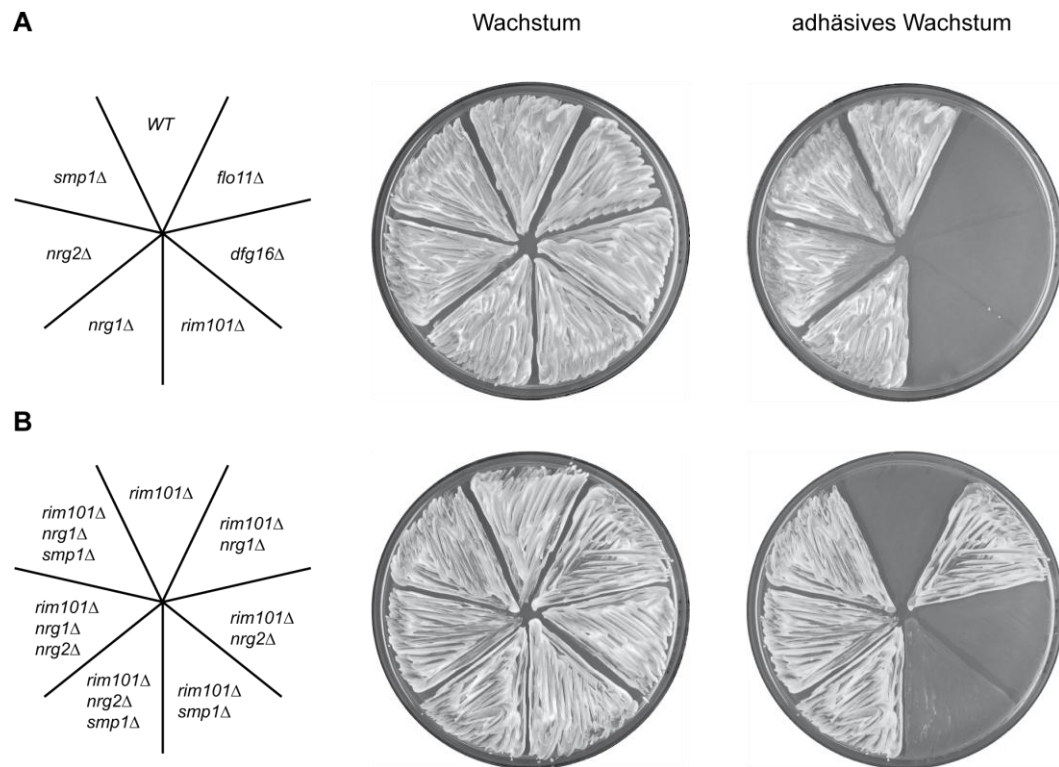
**Abbildung 13: Die Transkriptionsrepressoren Nrg1, Nrg2 und Smp1 werden *RIM101*-abhängig reguliert.**

Immunoblot: Die *S. cerevisiae*-Stämme YHUM0909 (WT), YHUM1610 (*NRG1-3HA*), YHUM1612 (*NRG2-3HA*), YHUM1614 (*SMP1-3HA*), YHUM1618 (*rim101Δ NRG1-3HA*), YHUM1620 (*rim101Δ NRG2-3HA*) und YHUM1622 (*rim101Δ SMP1-3HA*) wurden in YNB+Ura-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,7 angezogen. Die Transkriptionsrepressoren wurden durch einen Antikörper gegen ihr HA-Epitop detektiert (α-HA). Als interne Ladekontrolle diente das konstitutiv exprimierte Cdc28, die katalytische Untereinheit der Cyclin-abhängigen Protein-Kinase (α-Cdc28). Für die Quantifizierung wurde das Verhältnis von α-HA zu α-Cdc28 ermittelt (α-HA/α-Cdc28; Angaben in Prozent). Die Doppelbanden bei Nrg1-3HA und Smp1-3HA können auf unterschiedliche Phosphorylierungsstadien zurückgeführt werden (Berkey & Carlson, 2006; de Nadal *et al.*, 2003). (Diese Abb. wurde bereits in der betreuten Dipl.-Arbeit Schäfer, 2009, gezeigt.)

Um den Einfluss von *RIM101*, *NRG1*, *NRG2* und *SMP1* auf das adhäsive Wachstum zu untersuchen, wurden epistatische Analysen mit Deletionsmutanten dieser Transkriptionsfaktorgene des Rim101-Signalwegs in verschiedenen Kombinationen hergestellt. Außerdem wurde eine *dfg16*-Deletionsmutante für diese Analyse generiert. *DFG16* kodiert für ein Transmembranprotein, das als möglicher Sensor für alkalischen pH beschrieben wird, wenngleich diese Funktion noch nicht explizit zugewiesen werden konnte (Barwell *et al.*, 2005; Rothfels *et al.*, 2005).

Die Deletionsmutanten wurden mit Hilfe des *cre-lox* ortsspezifischen Rekombinationssystems, das es ermöglicht den Antibiotikamarker für die Herstellung weiterer Deletionen zu recyceln, hergestellt (Güldener *et al.*, 1996). Die *S. cerevisiae* Euroscarf Deletions-Kollektion des „European Saccharomyces Cerevisiae Archive For Functional Analysis“, die Deletionsmutanten aller nicht essentiellen Gene im S288c-Stammhintergrund vorhält, konnte für diese Arbeit nicht verwendet werden.

Hintergrund ist, dass eine Nonsense-Mutation in dem Gen *FLO8*, das für einen transkriptionellen Aktivator der Flokkuline *FLO1*, *FLO10* und *FLO11* kodiert, zu einem Verlust der Adhäsion und der Flokkulation führt (Bester *et al.*, 2006; Fichtner *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 1996).



**Abbildung 14 A und B: Regulation des adhäsiven Wachstums durch Komponenten des Rim101-Signalwegs**

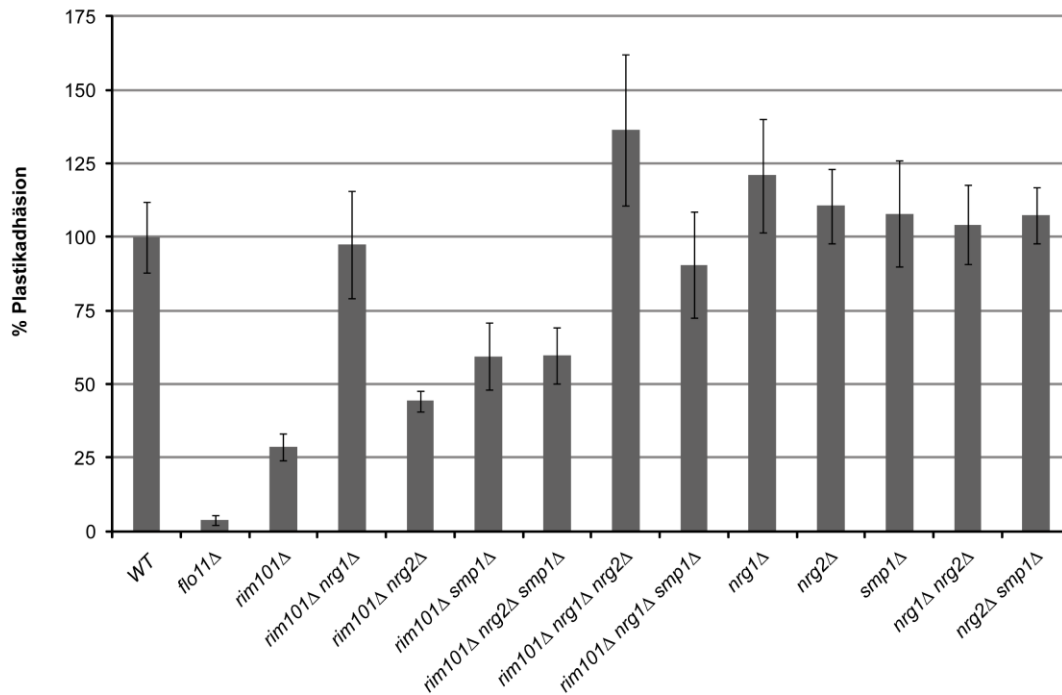
Die Stämme wurden für 7 Tage auf YNB+Ura-Platten (pH 5,5) inkubiert und vor (Wachstum) und nach (adhäsives Wachstum) einer Waschprozedur fotografiert. **A**) Die *flo11* (YHUM0924)-, *dfg16* (YHUM1455)- und *rim101* (YHUM1461)-Mutanten zeigen einen nicht adhäsiven Phänotyp. Die *nrg1* (YHUM1459)-, *nrg2* (YHUM1514)- und *smp1* (YHUM1463)-Transkriptionsrepressor-Deletionsmutanten zeigen wie der WT (YHUM0909) einen adhäsiven Phänotyp. **B**) Der nicht adhäsive Phänotyp einer *rim101Δ* (YHUM1461)-Mutation wird in der *rim101Δ nrg1Δ* (YHUM1522)-Doppelmutante und den *rim101Δ nrg2Δ smp1Δ* (YHUM1576)-, *rim101Δ nrg1Δ nrg2Δ* (YHUM1564)- sowie *rim101Δ nrg1Δ smp1Δ* (YHUM1566)-Dreifachmutanten supprimiert. Die *rim101Δ nrg2Δ* (YHUM1570)- und *rim101Δ smp1Δ* (YHUM1524)-Doppelmutanten zeigen einen nicht adhäsiven Phänotyp.

Mit einem Waschtest wurde in einem ersten Schritt die Adhäsionsfähigkeit der hergestellten Deletionsmutanten an die Agar-Oberfläche untersucht. Die verwendeten Stämme wurden auf YNB+Ura-Platten (pH 5,5) ausgestrichen und nach 7 Tagen einem Waschtest unterzogen (Abbildung 14 A und B). Wie erwartet zeigte der *flo11Δ*-Stamm, wie auch der *dfg16Δ*- und *rim101Δ*-Stamm keine Adhäsion. Die *nrg2*- und *smp1*-Deletionsmutanten waren etwa ebenso adhäsiv wie der Wildtypstamm. Ein hyperadhäsiver Phänotyp wird durch eine *nrg1Δ*-Mutation generiert. Von besonderem Interesse war, ob eine Kombination dieser Transkriptionsrepressormutationen eine *rim101Δ*-Mutation supprimieren kann und einen adhäsiven Phänotyp zeigt, da zum

einen bekannt ist, dass Rim101 direkt an die Promotoren von *NRG1* und *SMP1* bindet (Lamb & Mitchell, 2003) und dadurch die Möglichkeit einer direkten Repression dieser Transkriptionsrepressoren besteht. Zum anderen besitzen die Zinkfinger-DNA-Bindedomänen von Nrg1 und Nrg2 eine große Homologie zueinander, die nahelegt, dass sie gleiche DNA-Bindemotive im Promotor des Zielgens *FLO11* binden können. Der Waschtest (Abbildung 14 B) ergab für den untersuchten  $\Sigma 1278b$ -Stammhintergrund, dass der nicht adhäsive Phänotyp einer *rim101Δ*-Mutation durch eine *nrg1Δ*-Mutation und eine *nrg2Δ smp1Δ*-Doppelmutation supprimiert werden kann. Die zusätzliche Deletion von *NRG2* bzw. *SMP1* in der *rim101Δ nrg1Δ*-Doppelmutante führte zu keiner veränderten Adhäsion. Eine *smp1Δ*-Mutation supprimierte im Gegensatz zu den Ergebnissen im SK1-Stammhintergrund (Lamb & Mitchell, 2003) eine *rim101Δ*-Mutation im  $\Sigma 1278b$ -Stammhintergrund nicht. Eine *rim101Δ smp1Δ*-Doppelmutante wies daher ebenfalls keinen adhäsiven Phänotyp auf. Dieses Ergebnis deutet auf eine unterschiedlich regulierte *FLO11*-Expression innerhalb dieser beiden *S. cerevisiae*-Stammhintergründe durch den Rim101-Signalweg hin.

Nach dieser qualitativen Untersuchung der Zell-Oberflächen-Adhäsion an Agar wurde die Adhäsionsfähigkeit in einem nächsten Schritt durch einen Waschtest an Polystyrol quantifiziert (Abbildung 15). Bei der hier ausgebildeten Adhäsion an Plastik handelt es sich um eine zuckerunabhängige Adhäsion an eine abiotische Oberfläche, die durch hydrophobe Wechselwirkung zwischen Zelle und Oberfläche zustande kommt (Verstrepen & Klis, 2006). Zusätzlich zu den bereits auf Agaradhäsion getesteten Deletionsstämmen wurden auch eine *nrg1Δ nrg2Δ*- und eine *nrg2Δ smp1Δ*-Mutante überprüft. Die Stämme wurden dazu in YNB+Ura bis zu einer  $OD_{600} = 0,7$  angezogen und anschließend für weitere 3 h in YNB+Ura-Medium (pH 4,5; 25 mM HEPES gepuffert) in Polystyrol-Mikrotiterplatten inkubiert. Danach erfolgte eine Anfärbung der Zellen in den einzelnen Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit Kristallviolett. Nicht adhärente Zellen konnten nachher gewaschen werden. Der an den adhären Zellen gebundene Farbstoff wurde anschließend gelöst und die Absorption bei 595 nm gemessen (Reynolds & Fink, 2001). Als Kontrolle diente ein *flo11Δ*-Stamm, der nicht adhäsiv ist. Die Adhäsion des Wildtypstamms wurde gleich 100 % gesetzt, worauf sich alle Messergebnisse beziehen.



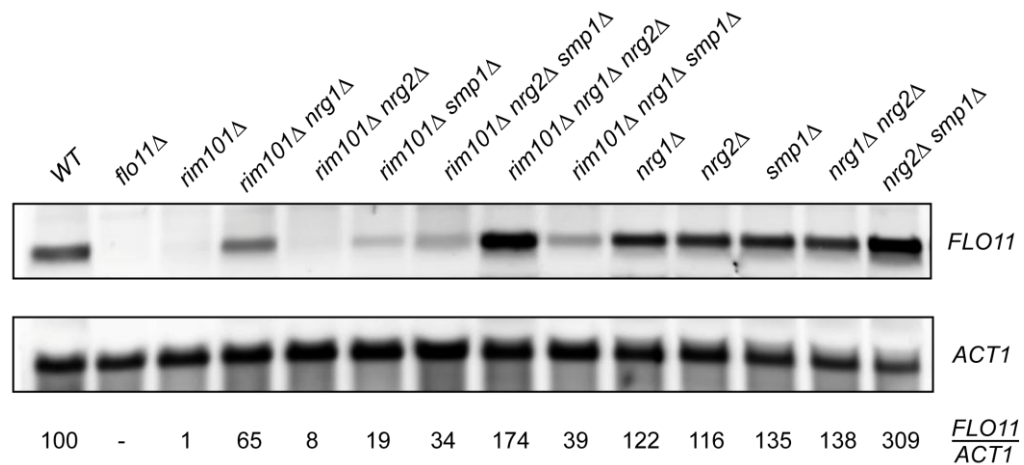


**Abbildung 15: Quantitative Bestimmung der Adhäsion an Polystyrol von Hefestämmen, die verschiedene Rim101-Signalwegskomponenten tragen**

Die Stämme wurden in YNB+Ura-Medium bis zu einer  $OD_{600} = 0,7$  angezogen und anschließend in YNB+Ura-Medium (pH 4,5; 25 mM HEPES gepuffert) für weitere 3 h in Polystyrol-Mikrotiterplatten inkubiert. Die Adhäsionsfähigkeit der Wildtyp-Zellen wurde gleich 100 % gesetzt. Die Testreihe zeigt den Durchschnitt von vier Messwerten. Verwendete Stämme: WT (YHUM0909), *flo11Δ* (YHUM0924), *rim101Δ* (YHUM1461), *rim101Δ nrg1Δ* (YHUM1522), *rim101Δ nrg2Δ* (YHUM1570), *rim101Δ smp1Δ* (YHUM1524), *rim101Δ nrg2Δ smp1Δ* (YHUM1576), *rim101Δ nrg1Δ nrg2Δ* (YHUM1564), *rim101Δ nrg1Δ smp1Δ* (YHUM1566), *nrg1Δ* (YHUM1459), *nrg2Δ* (YHUM1514), *smp1Δ* (YHUM1463), *nrg1Δ nrg2Δ* (YHUM1530) und *nrg2Δ smp1Δ* (YHUM1574).

Ergebnis dieser quantitativen (Abbildung 15) wie auch der qualitativen Adhäsionsanalyse an Agar (Abbildung 14) war, dass das Adhäsionsverhalten der getesteten Deletionsmutanten ähnlich ist. Der Adhäsionsverlust einer *rim101*-Deletion wurde in beiden Versuchsansätzen in den untersuchten Doppel- und Dreifachmutanten, die eine *nrg1*-Deletion tragen, supprimiert, wobei bereits das Vorhandensein allein dieser zusätzlichen Mutation ausreicht. Unterschiede ergaben sich bei der quantitativen Adhäsionsanalyse im Vergleich zur Adhäsionsanalyse an Agar durch einen um die Hälfte reduzierten Adhäsionsverlust von *rim101*-Deletionsmutanten, in denen zusätzlich *NRG2* bzw. *SMP1* deletiert ist. Der Befund, dass der Adhäsionsverlust der *rim101Δ nrg2Δ smp1Δ*-Dreifachmutante in der quantitativen Analyse stärker ausfiel als im Agaradhäsionstest, ist sicherlich in den unterschiedlich angelegten Versuchsbedingungen, im Besonderen der verkürzten Inkubationszeit begründet und wird wahrscheinlich durch Nrg1 vermittelt. Während sich die auf Agarplatten inkubierten Zellen in der stationären Phase befinden, zeigen die in Polystyrol-Mikrotiterplatten

inkubierten Zellen während der dreistündigen Ruheinkubation ohne Schütteln sehr langsames Wachstum. Im Verlauf dieser Kurzinkubation wird der *NRG1*-abhängige Adhäsionsverlust durch eine zusätzliche Deletion von *NRG2* und *SMP1* wahrscheinlich nicht ausreichend kompensiert. Eine Deletion von *NRG1*, *NRG2* und *SMP1* in verschiedenen Kombinationen führt zu einer dem Wildtyp ähnlichen Adhäsion.

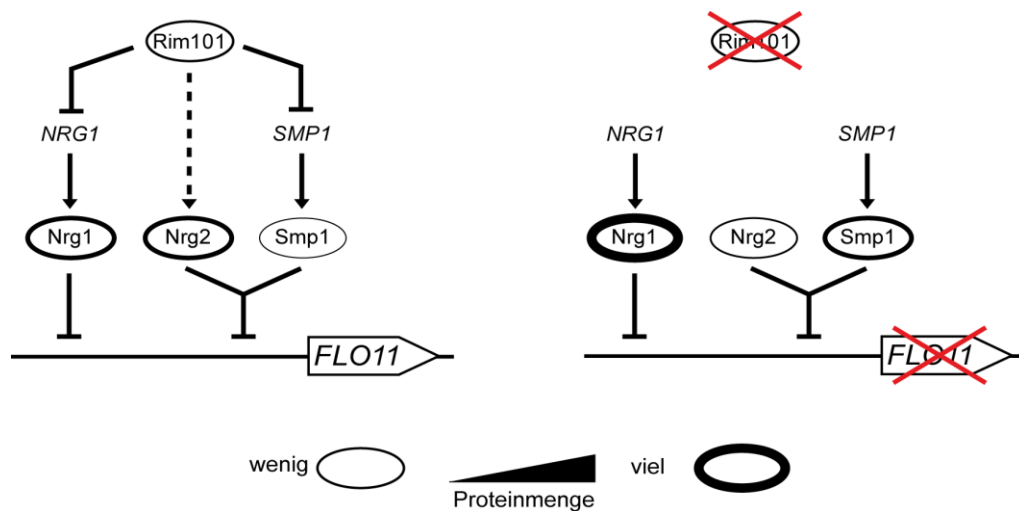


**Abbildung 16: Regulation der *FLO11*-Expression durch verschiedene Rim101-Signalwegskomponenten**

Transkript-Analyse: Die Stämme wurden in YNB+Ura-Medium bis zu einer  $OD_{600} = 0,7$  inkubiert und anschließend die Gesamt-RNA der für 3 h in YNB+Ura-Medium (pH 4,5 gepuffert) weiterinkubierten *S. cerevisiae*-Stämme isoliert. Die Transkriptmengen von *FLO11* und *ACT1* wurden durch eine Northern-Analyse bestimmt und es wurde für die Quantifizierung das Verhältnis zu *ACT1* ermittelt. Als Bezugsgröße diente der WT-Stamm (Angaben in Prozent). Verwendete Stämme: WT (YHUM0909), *flo11Δ* (YHUM0924), *rim101Δ* (YHUM1461), *rim101Δ nrg1Δ* (YHUM1522), *rim101Δ nrg2Δ* (YHUM1570), *rim101Δ smp1Δ* (YHUM1524), *rim101Δ nrg2Δ smp1Δ* (YHUM1576), *rim101Δ nrg1Δ nrg2Δ* (YHUM1564), *rim101Δ nrg1Δ smp1Δ* (YHUM1566), *nrg1Δ* (YHUM1459), *nrg2Δ* (YHUM1514), *smp1Δ* (YHUM1463), *nrg1Δ nrg2Δ* (YHUM1530) und *nrg2Δ smp1Δ* (YHUM1574).

Um die *RIM101*-abhängige Regulation von *FLO11* durch die für die Transkriptions-repressoren Nrg1, Nrg2 und Smp1 kodierenden Gene zu untersuchen, wurde die *FLO11*-Transkriptmenge der in Abbildung 15 untersuchten Deletionsmutanten unter gleichen Bedingungen bestimmt (Abbildung 16). Die *FLO11*-Transkriptmenge der *rim101Δ*-Deletionsmutante war kaum nachweisbar und geht mit einem nicht adhäsiven Phänotyp einher. Die Suppression einer *rim101Δ*-Mutation in einer *rim101Δ nrg1Δ*-Doppelmutante, die eine dem Wildtyp-Niveau entsprechende Adhäsion aufweist, bzw. das Adhäsionsniveau einer *rim101Δ nrg2Δ smp1Δ*-Dreifachmutante, das etwa der Hälfte dieses Wertes entspricht, geht mit einer differenzierten Zunahme an *FLO11*-Transkript einher. Bereits die geringe *FLO11*-Transkriptmenge einer *rim101Δ nrg2Δ*-Doppelmutante führt zum Überschreiten eines Schwellenwertes, der ausreicht, um fast die Hälfte der Adhäsion des Wildtyps zu erreichen. Dies gilt ebenso für eine *rim101Δ smp1Δ*-Doppelmutante, wie in Abbildung 15 dargestellt werden konnte. Diese Befunde lassen jedoch nicht den Schluss zu, dass die Flo11-vermittelte Adhäsion immer

mit der Menge an *FLO11*-Transkript korreliert, da fast identische *FLO11*-Transkriptmengen in den *rim101Δ nrg2Δ smp1Δ*- und *rim101Δ nrg1Δ smp1Δ*-Dreifachmutanten trotzdem zu einem unterschiedlich starken Adhäsionsphänotyp führen, was ein Indiz für eine weitere posttranskriptionelle Regulation in diesen Stämmen sein könnte. Die Northern-Analyse zeigte außerdem, dass eine Einzel- oder kombinierte Deletion der für die Transkriptionsrepressoren Nrg1, Nrg2 und Smp1 kordierenden Gene immer zu einer gegenüber dem Wildtyp um 20-40 % erhöhten *FLO11*-Transkriptmenge führt, was mit einer leichten, aber nicht ebenso starken Erhöhung der Adhäsion einhergeht. Ein um den Faktor drei erhöhtes *FLO11*-Transkript konnte für die *nrg2Δ smp1Δ*-Doppelmutante nachgewiesen werden.



**Abbildung 17: Modell der Rim101-abhängigen *FLO11*-Regulation durch die Transkriptionsrepressoren Nrg1, Nrg2 und Smp1**

In Anwesenheit von Rim101 wird die *NRG1*- und *SMP1*-Transkription reprimiert (Lamb & Mitchell, 2003). Die vorhandenen Mengen an Nrg1, Nrg2 und Smp1 reichen nicht für eine *FLO11*-Repression aus. In Abwesenheit von Rim101 nimmt die Menge an Nrg1 und Smp1 zu. Durch epistatische Analysen konnte gezeigt werden, dass Nrg1 allein oder die remanente Menge an Nrg2 in Kombination mit Smp1 zu einer *FLO11*-Repression führt.

Die in diesem Kapitel beschriebenen Ergebnisse bestätigen, dass Rim101 *FLO11* über die drei Transkriptionsrepressoren Nrg1, Nrg2 und Smp1 regulieren kann. Aus den gewonnenen Ergebnissen lässt sich folgendes Modell ableiten (Abbildung 17). In Gegenwart von Rim101 resultiert die *NRG1*-Expression in einer moderaten Proteinmenge, die für eine *FLO11*-Repression nicht ausreicht und dem Normalniveau eines Wildtypstamms entspricht. In Abbildung 15 und Abbildung 16 wurde gezeigt, dass eine *nrg1*-Deletionsmutante eine stärkere Adhäsion und eine höhere *FLO11*-Transkriptmenge aufweist als ein Wildtypstamm, was erkennen lässt, dass Nrg1 stets eine konstitutiv vorhandene leicht repressive Wirkung auf die *FLO11*-Expression ausübt. Der Transkriptionsrepressor Nrg2, dessen Proteinmenge etwa dem Niveau von

Nrg1 entspricht, hat neben dem kaum nachweisbaren Smp1 in Gegenwart von *RIM101* einen ähnlichen regulatorischen Effekt bezüglich Adhäsion und *FLO11*-Transkriptmenge wie Nrg1. In Abwesenheit von *RIM101* verändert sich die Expression der drei Transkriptionsrepressoren drastisch. Die Nrg1-Menge ist stark erhöht, da *NRG1* nicht mehr der Rim101-Repression unterliegt (Lamb & Mitchell, 2003). Während die Nrg2-Menge abnimmt - Rim101 wirkt wahrscheinlich indirekt positiv regulierend auf Expression von *NRG2* - erhöht sich die Menge an Smp1, das ebenfalls nicht mehr durch Rim101 transkriptionell reprimiert wird (Lamb & Mitchell, 2003). Die veränderten Transkriptionsrepressor-Niveaus führen nun zu einer Repression der *FLO11*-Expression. Die epistatischen Analysen zeigen, dass entweder Nrg1 allein oder Nrg2 in Kombination mit Smp1 für eine Repression von *FLO11* ausreicht. Diese Ergebnisse für den  $\Sigma 1278b$ -Stammhintergrund werden durch Versuche im SK1-Stammhintergrund ergänzt, in dem der nicht adhäsive Phänotyp einer *rim101Δ*-Mutation in einer *rim101Δ smp1Δ*-Doppelmutante supprimiert wird (Lamb & Mitchell, 2003).

## 2.2 Feinanalyse der Regulation des *FLO11*-Promotors durch die Transkriptionsfaktoren Nrg1, Nrg2 und Smp1

Es sind mehrere Signaltransduktionswege bekannt, die die Expression von *FLO11* und damit die Fähigkeit der Adhäsion beim diploid pseudohyphalen und haploid adhäsiven Wachstum regulieren. Die komplexe *FLO11*-Regulation spiegelt sich in dem außergewöhnlich großen *FLO11*-Promotor wider, der mit einer Länge von etwa 3 kb deutlich über der durchschnittlichen *S. cerevisiae*-Promotorlänge von etwa 300 bp liegt und zu den größten bekannten Promotoren in diesem Organismus gehört (Dujon, 1996; Rupp *et al.*, 1999). Wie bereits dargestellt werden konnte, korreliert der Adhäsionsverlust einer *rim101*-Deletionsmutante mit einer stark reduzierten *FLO11*-Expression, die durch die Transkriptionsrepressoren Nrg1, Nrg2 und Smp1 reguliert wird. In einem nächsten Schritt wurde der *FLO11*-Promotor daher auf potentielle Nrg1-, Nrg2- und Smp1-Bindestellen analysiert. Außerdem war von Interesse, die Bindeaffinität ausgewählter *FLO11*-Promotorbereiche zu den Transkriptionsfaktoren Nrg1 und Nrg2 zu untersuchen, sowie die *in vivo*-Funktion potentieller Nrg1-Motive im *FLO11*-Promotor zu bestimmen. Zudem sollten Regionen im *FLO11*-Promotor ermittelt werden, die durch Nrg1, Nrg2 und Smp1 indirekt reguliert werden.

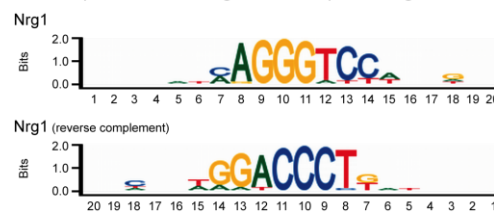
### 2.2.1 Bioinformatische Analyse des *FLO11*-Promotors auf mögliche Nrg1-, Nrg2- und Smp1-Bindestellen

Der etwa 3000 bp lange *FLO11*-Promotor aus *S. cerevisiae*  $\Sigma 1278b$  (Fichtner *et al.*, 2007) wurde im Hinblick auf Nrg1-Bindemotive untersucht. In der Literatur werden bisher vier verschiedene DNA-Sequenzen beschrieben, die durch *S. cerevisiae* Nrg1 gebunden werden können (Abbildung 18).

Bekannte Nrg1-Bindemotive (BM):

Nrg1-BM I: 5'-CCCTC-3' Park *et al.*, 1999  
 Nrg1-BM II: 5'-CCCCCT-3' Park *et al.*, 1999  
 Nrg1-BM III: 5'-GGACCCT-3' Harbison *et al.*, 2004  
 Nrg1-BM IV: 5'-AGACCCT-3' Platara *et al.*, 2004

PWM (Position Weight Matrix) für Nrg1-Bindestellen:



Zhu *et al.*, 2009

#### Abbildung 18: Bekannte Nrg1-Bindemotive

Abgebildet sind aus der Literatur bekannte Nrg1-Bindemotive, sowie die PWM (Position Weight Matrix) für Nrg1 (Zhu *et al.*, 2009): Die y-Achse bzw. die Größe der einzelnen Buchstaben ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, mit der die jeweiligen Basen an den entsprechenden Positionen der Bindestelle vorkommen. Die x-Achse gibt die Position der Nukleotide auf dem *Microarray*-Oligomer an. Quelle: <http://thebrain.bwh.harvard.edu/uniprobe/>

Die Nrg1-Bindemotive I-III konnten auch in der *FLO11*-Promotorsequenz nachgewiesen werden (Abbildung 19). Nrg1-Bindemotiv I (Park *et al.*, 1999) kommt einmal alleine vor und liegt in zwei Fällen in der Nähe von Nrg1-Bindemotiv II oder überlappt mit diesem wie an Position -2739 bis -2734 stromaufwärts vom ATG-Startcodon. Weitere 600 bp stromaufwärts dieser möglichen Nrg1-Bindestelle befindet sich ein 17 bp überspannender Sequenzabschnitt, der ein Nrg1-BM I (-2133 bis -2129) und ein Nrg1-BM II (-2121 bis -2117) trägt, die von einander nur sieben Nukleotide entfernt liegen. Ein weiteres Nrg1-BM I liegt zwischen Position -69 und -65. Das Nrg1-BM III (Harbison *et al.*, 2004) liegt etwa in der Mitte des *FLO11*-Promotors innerhalb der Nukleotide -1650 bis -1644. Das diesem Motiv sehr ähnliche vierte bekannte Nrg1-BM (Platara *et al.*, 2006) konnte in der *FLO11*-Promotorsequenz des *S. cerevisiae*-Stamms  $\Sigma 1278b$  nicht gefunden werden. Alle hier für Nrg1 beschriebenen Bindemotive werden auch durch die Position Weight Matrix (PWM) in Abbildung 18 dargestellt

(Zhu *et al.*, 2009). Die Promotoranalyse ergab somit fünf Sequenzen, die im *FLO11*-Promotor durch Nrg1 gebunden werden könnten.

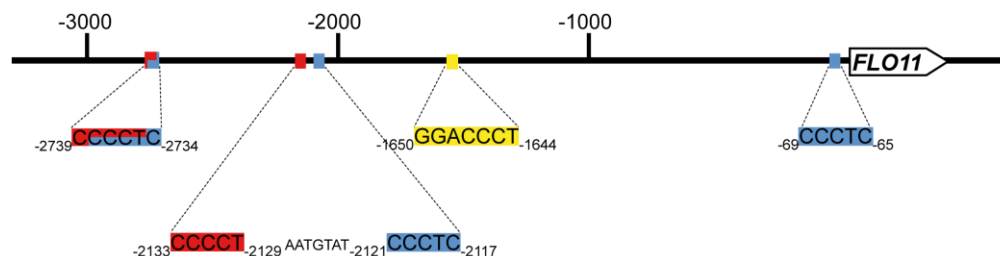
## A

```

-3017 AGTCTTCGTT TCCTATCTCC ACATACCAAT CACTCGTTTG TTACTAATTC GAATAATTTA CTGCTGTAAG GAGTCGTACC
-2937 GCCAACTAAA TCTGAATAAC AATTGCGCTG CTAGAAGTTA AAAAGTAGGC GCTGCAATGA TTATGTGGTA TGATCAGATT
-2857 GTGTCGCAAC GCTCAGCGGG GTTTTGGCTC AATGGGACCG CTGCTAATAA AACGTTTAAC TAGCGAATTT TGAACACAC
-2777 CCGTTGACAA AAGTATAAGG AGTCTCTTTC CGTGAGTTCC CCTCTTCCTC TCACTGCACT TCAACTATGC CTTATAGCAA
-2697 CCAAGAAGCT AGAAAATGCC AACTATTAAA AAGATAACCT CTTTGGAAGC AAATAAAACG GAGATTATCT TGGGATCTAT
-2617 TTCACAAATT TACGGCTAAT TGGAATGAAC AGCGCCAAGT AGCACTGGTC AAAGTGCAGA GAGTATTAGA ACTTGCTTTA
-2537 TTCCGTATAT CGTACTTTAG GTCGTCAAGT TTACCACTTC GGTACGCAAA TGAAAATGAA AAGCTCATTG ACAACTTAGA
-2457 CACAATTTCC CCGTTTACAA GTAGCTGAAA AGTCCATCTA TCGAATTATG AATGATACTA TTTTAAATAT AGTCGTTGCT
-2377 GCACGCGTTT TCCATGTTCT TTTTATCCAC ACATCCCGATG TTTTACTTAC AGTTGAGCAT CTCAGGGCCA GCGACAAATA
-2297 TAAACATATT ATACTCAAAA TGAAGCTCGT TGAAAAGAGA ATATTTCTTA ACCTCTTTTA CAGTGTTTTT AACACCTTTT
-2217 CATCTGTGTG CCATGTCAGA TTAAGGATGC TCAACTTTTC GAATTATTAT TACAAATTTT AAAGAAATTA CTAGTCCTTT
-2137 TTGTCCCTTA ATGTATCCCT GATTTCATAC CGTCGTTTTC GGGTTCCAAC TACGTATAGC TTTCAAGTGT GGTTTTACGG
-2057 TAAGAACAAAC CCCCATCGG TTAGTGCGGA ATACTTTCTT ATTCTCATCG AGAGCCGAGC CATACACCTA AGGTGGACAG
-1977 AAAGCTAAAA TTCCAACAGA AAAATCTAAC ATCTTTGCTC CCTTACAAGT AGGAACGCTA GCGTATCAAC CCATCTCCAG
-1897 ATTTGCCAG CATTTCTGTA GAACACCCAA TGCGAATGAA GACTAATGAA TATTGTAAGG AAAAAAATTA GGAAAAGTTT
-1817 AATTGGTGAT GGTCTCTACC ACCCAAAAC GGTCCCTTG C ATGCATTGAG GTCATGACC TGCAGTACTT GTTTTTCTCG
-1737 AATGTTTTTT ACCATCTCTT TTTTCTTAT CTGAGCTGCT GACGACAGCG GACATTGTTT CATATTTCTGA AAGCTGTGCG
-1657 GGAAAACGGA CCCTAACACG AATGTGAATG CGCTAATCGG TATTTCCACC ACATGAAACC TGCTACTTTT TCAGTCTCTT
-1577 TCGTATGCAT TTCCCAAAAT TCATTCTGAG CTTGTGCAAC TTAGACTCAG TTCCACGGCG TGCAGGACGG GGTATTATGA
-1497 ATAAAGGAT CCACGGGCGA GATTGTGTTCT ATGTTTTAGG TATGGAGTTT TGTACCACAA AACTTTAGGA ATACCGGATT
-1417 GTGTGCCTAC GCCAGCCCA GAGTATGTTT TCACAGCTGT AATTCCTCGT GATCTTTTCC TGCTCCAAT AGGAACGCCG
-1337 GCAGGCAAT TAAACTTTCC CGGCAGGAAA AAAAGGCTTT TCTTTTTTGC CTTTCAGTTT CTCGGAATGT GGCATTACAT
-1257 AAGCAAAATC CTTTTTGGGT GTGCTTGAA AGTTCAAAT AAGGTTTTT TCTTCTGTTT TCTTGACAAG AAAATGTCGC
-1177 AAGAGAAATG CGCCCAAGG GTTTCGGCCG TTATTTCCCT ATCGAAGTGG GTCCTTTTTC TCTTTAGTCC TTCTCTGGGG
-1097 CTAGCGATCA CTGCAAAATT AGGCTTTACT GGTACGAGTT AACTTTTTTT CTTTTTTTTT GTCATCCTTT TCTTTGGGGC
-1017 TAAGAAATGA CTTCCCTTTT CTTTTTCTT GTTGACGAG TGGCTTCAAA GAACTGCTGA TTGCTCAAGG CAATCAGTCC
-937 GAGCGTTTAG AAGGTGATTG TAGGCAGAAA TTAACCTTTC GGTAAAAGAA TGACATTCTT TCTTAAAGA AAAATTAGCT
-857 TTTTTTTGTC AGGCATTGCA CAAACTTTTT TATTCTGCC TATACTCTTA AACAGATCAG TCATTATATG TGCTTTTTTA
-777 ACGGTCGTAC TGGGACATCG CATGCCCTGG GATTCCGTAA TTAGGTGCAA CAATACGGGC ACAACTCATT CTGCGCTATC
-697 TTCACGGACA GAACTTCTAT TGCCTATCGG TGGTGTGATT AACAATTGGA AGCGCAGAGC TTGGAATGGA TTTTCAATTC
-617 AATGGAATTT GAGGTATTCT TTTGTTTACT AATATTTTACT TTGAGGACAT TGTCCAACCC TAAAAGTGCC TGTTCAGAA
-537 TAGAATAACA TTATGATACG TTTTCTTGAC CGCTGAGCAA TTTAAAGCAA CTATTAGGGT ACGATTGTTT CTAGAGAAAT
-457 GTGGGTCATC TTTTtaggtc CGTCTCTTCT TGATGAGGTA ACCTTTTCTT TACAAAAATG TCATAGAGTT ACCAATTGGG
-377 ATTCAAGGCA TCATCGCAAT ATACTCGTT CTTTACGGA GAAATTAAGC TCTTCCACT TTGAATTAAC TGTTAGACTT
-297 GTCTTATCTG AGGAATGTCC GTGTTCAAAT TAAATAAAAA TTTAGGGCAG TTTTATTTAC CTTAACAAT ATGTTCAAGC
-217 ATGTAGGTTA CTGCGCTCTC TTCTAGTTCA AGAACGGATA ACTCATAGAC TTACCAGTAC AAGTTGTTGA AGGGTCCCA
-137 ATTGATAAAA AAGGATCTTT TGCTTCCTAA AATAAACGTA TAAAAGCAC CCTATTCATC AGTATACTCC CTGATCATGT
-57 TGTGGTTCTA ATTAAGAATA TACTTTTGTA GGCCTCAAAA ATCCATATAC GCACACT

```

## B



**Abbildung 19: *FLO11*-Promotorsequenz mit potentiellen Nrg1-Bindemotiven**

A) Die stromaufwärts des ATG-Startcodons liegende Sequenz von *FLO11* (Position -3017 bis -1) enthält mehrere potentielle Nrg1-Bindemotive. Nrg1-BM I 5'-CCCTC-3' (blau) kommt 3-mal im *FLO11*-Promotor vor: -2738 bis -2734, -2121 bis -2117 und -69 bis -65. Nrg1-BM II 5'-CCCCT-3' (rot) kommt an zwei Stellen im *FLO11*-Promotor vor: -2739 bis -2735 und -2129 bis -2125. Nrg1-BM III 5'-GGACCCT-3' (gelb) kommt einmal innerhalb des Promotors vor: -1650 bis -1644. B) Die schematische Darstellung des *FLO11*-Promotors zeigt die Lage der in der Literatur beschriebenen Nrg1-Bindemotive innerhalb des Promotors. Die Farben der verschiedenen Bindemotive entsprechen den Angaben in A. (Abb. 19 A&B modifiziert aus der betreuten Dipl.-Arbeit Schäfer, 2009.)

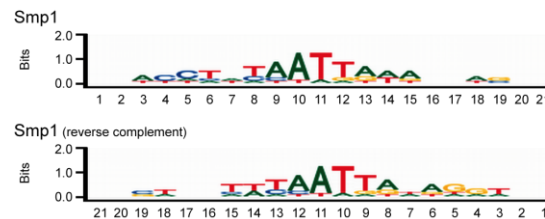


Für den Transkriptionsrepressor Nrg2 sind bisher keine Bindemotive in der Literatur beschrieben worden. Möglicherweise kann Nrg2 aufgrund seiner großen Homologie innerhalb der Zinkfinger-DNA-Bindedomäne (Vyas *et al.*, 2001) an ähnliche Sequenzbereiche wie Nrg1 binden. Hierzu ist allerdings bisher nichts bekannt.

Bekannte Smp1-Bindemotive (BM):

Smp1-BM I: 5'-ACTACTA(A/T)<sub>4</sub>TAG-3'      Dodou & Treisman, 1997

PWM (Position Weight Matrix) für Smp1-Bindestellen:



Zhu *et al.*, 2009

#### Abbildung 20: Bekannte Smp1-Bindemotive

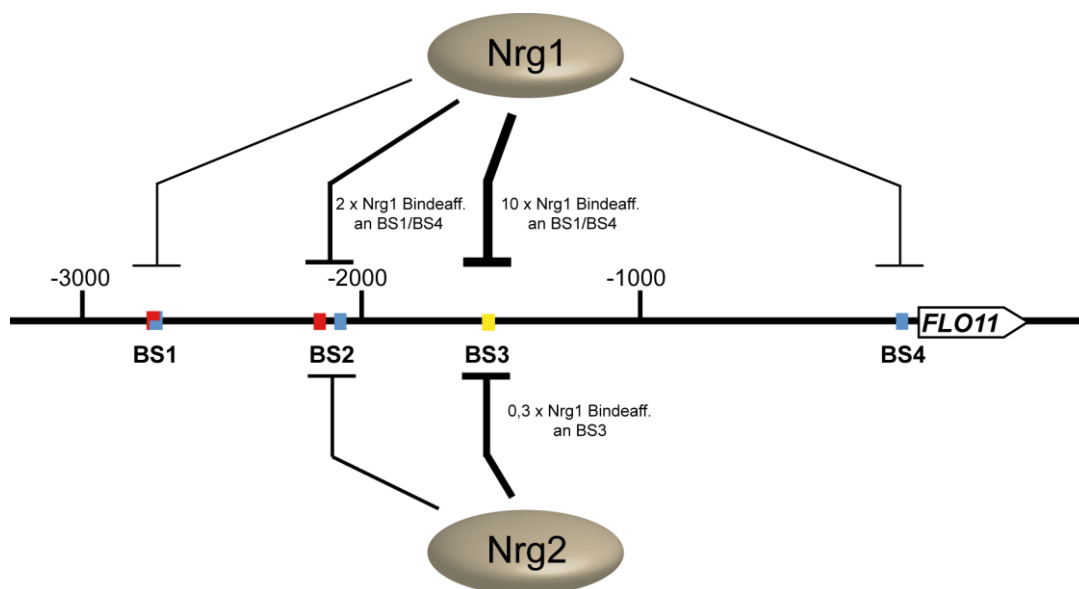
Abgebildet ist das aus der Literatur bekannte Smp1-Bindemotiv, sowie die PWM (Position Weight Matrix) für Smp1 nach (Zhu *et al.*, 2009): Die y-Achse bzw. die Größe der einzelnen Buchstaben ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, mit der die jeweiligen Basen an den entsprechenden Positionen der Bindestelle vorkommen. Die x-Achse gibt die Position der Nukleotide auf dem *Microarray*-Oligomer an. Quelle: <http://thebrain.bwh.harvard.edu/uniprobe/>

Der Transkriptionsfaktor Smp1 kann mit seiner MADS-Box-DNA-Bindedomäne an das Motiv 5'-ACTACTA(A/T)<sub>4</sub>TAG-3' binden (Dodou & Treisman, 1997), das bisher neben der PWM (Abbildung 20) von Zhu *et al.*, 2009, das einzig bekannte Bindemotiv ist. Dieses Motiv konnte im *FLO11*-Promotor jedoch nicht nachgewiesen werden.

### 2.2.2 Bestimmung des Bindeverhaltens von Nrg1 und Nrg2 an DNA-Fragmente des *FLO11*-Promotors mittels EMSA

Im Rahmen einer von mir betreuten Diplomarbeit (Schäfer, 2009) wurde heterolog exprimiertes und aufgereinigtes HIS-GST-Nrg1 und HIS-GST-Nrg2 auf seine Bindeaffinität zu Nrg1-Bindestellen, die im *FLO11*-Promotor nachgewiesen werden konnten (Abbildung 18, Abbildung 19), mittels EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) untersucht. Hierzu wurden synthetische DNA-Fragmente generiert, deren Sequenz jeweils einer der zu untersuchenden Nrg1-Bindestellen innerhalb des *FLO11*-Promotors entsprach. Die Sequenzen waren zu den in *lacZ*-Reporter-gen-Versuchen verwendeten DNA-Fragmenten identisch, im Gegensatz zu diesen jedoch teilweise Cy5-fluoreszenzmarkiert (Tabelle 2; vgl. Kapitel 2.2.3 ): *FLO11*-BS1, -BS2, -BS3,

-BS3M (-BS3 mutiert, Negativkontrolle), -BS4 und *ENA1*-BS1 (Kontrolle). Durch Bandshift-Experimente konnte die Bindeaffinität des Transkriptionsrepressors HIS-GST-Nrg1 zu den vier untersuchten Bindestellen *FLO11*-BS1 (Kombination von Nrg1-BM I & II 5'-CCCCTC-3'), *FLO11*-BS2 (Nrg1-BM I 5'-CCCTC-3' und Nrg1-BM II 5'-CCCCT-3'), *FLO11*-BS3 (Nrg1-BM III 5'-GGACCCT-3') und *FLO11*-BS4 (Nrg1-BM II 5'-CCCCT-3') nachgewiesen werden (Abbildung 21). Die geringste Affinität bestand zu den DNA-Fragmenten *FLO11*-BS1 und *FLO11*-BS4. Kompetitions-Experimente zeigten, dass diese Elemente eine etwa 10-fach geringere Affinität zu HIS-GST-Nrg1 besitzen als *FLO11*-BS3. Die HIS-GST-Nrg1-Bindeaffinität zu *FLO11*-BS1 und -BS4 liegt etwa auf dem gleichen Niveau wie die von Fragment *FLO11*-BS3M (Nrg1-BM III mut. 5'-GGATTCT-3', Negativkontrolle), das ein mutiertes Nrg1-Bindemotiv enthält und im Vergleich zu *FLO11*-BS3 die HIS-GST-Nrg1 Bindeaffinität drastisch reduzierte. Für das Fragment *FLO11*-BS2, das zwei Nrg1-Bindemotive trägt, konnte eine etwa doppelt so hohe Bindeaffinität wie für *FLO11*-BS1 und -BS4 zu HIS-GST-Nrg1 ermittelt werden, die im Vergleich zu *FLO11*-BS3 jedoch fünfmal geringer war. Die höchste Affinität zu HIS-GST-Nrg1 konnte für das Promotorfragment *FLO11*-BS3 (Nrg1-BM III 5'-GGACCCT-3') festgestellt werden. Es handelt sich hierbei um eine bisher unbekannte, aber möglicherweise zentrale Bindestelle im *FLO11*-Promotor.



**Abbildung 21: Bindeaffinitäten von Nrg1 und Nrg2 an *FLO11*-Bindesequenzen**

Schematische Zusammenfassung der *in vitro* mittels EMSA überprüften Bindeaffinitäten der Transkriptionsrepressoren Nrg1 und Nrg2 an ausgewählte Nrg1-Bindesequenzen des *FLO11*-Promotors. Analysiert wurde die Bindeaffinität von Nrg1 an die DNA-Fragmente *FLO11*-BS1 (Kombination von Nrg1-BM I & II 5'-CCCCTC-3'), *FLO11*-BS2 (Nrg1-BM I 5'-CCCTC-3' und Nrg1-BM II 5'-CCCCT-3'), *FLO11*-BS3 (Nrg1-BM III 5'-GGACCCT-3') und *FLO11*-BS4 (Nrg1-BM II 5'-CCCCT-3') und von Nrg2 an die DNA-Fragmente *FLO11*-BS2 und *FLO11*-BS3 mittels kompetitiver Bandshift-Experimente. Die Stärke der Linien gibt die relative Bindeaffinität der Transkriptionsrepressoren an die URS (Upstream Repressing Sequence) der getesteten DNA-Fragmente wieder.



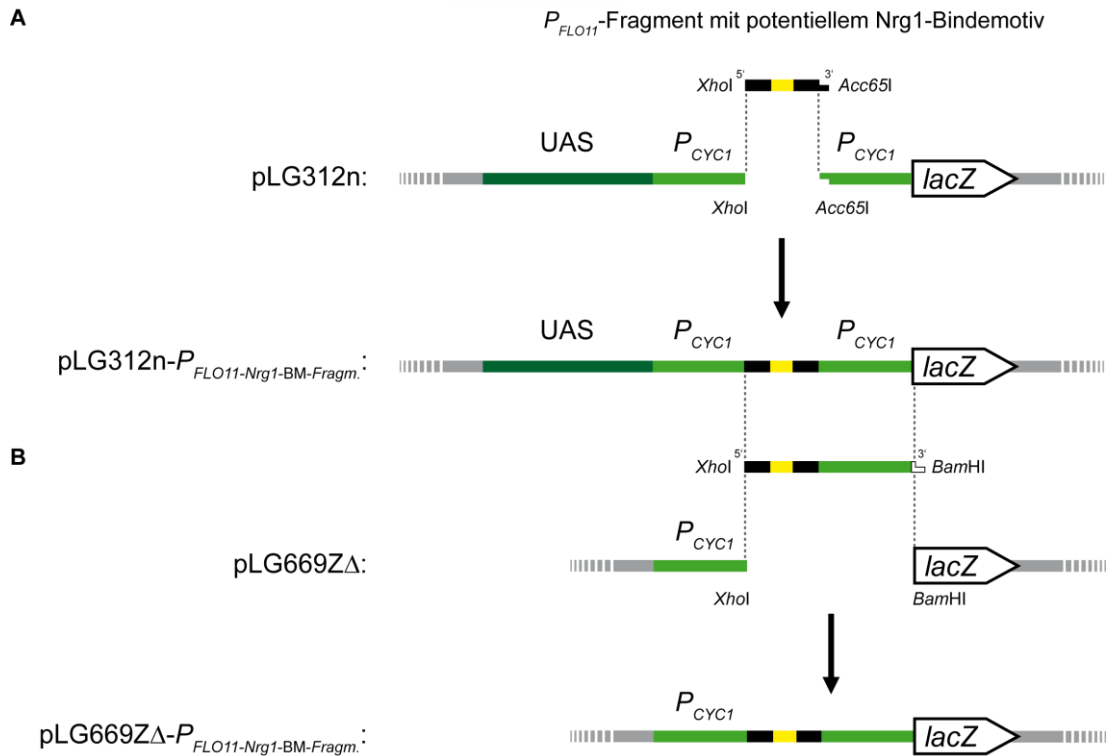
Das verwendete Kontroll-Promotorfragment *ENAI*-BS1 (Nrg1-BM IV 5'-AGACCCT-3') hatte eine ähnliche Affinität zu HIS-GST-Nrg1 wie *FLO11*-BS3. Ein Bereich des *ENAI*-Promotors, der die Sequenz *ENAI*-BS1 enthält, konnte auch in anderen Bandshift-Experimenten mit einer ähnlich hohen Affinität durch GST-Nrg1 gebunden werden (Platara *et al.*, 2006).

Bisher war nicht bekannt, ob Nrg2 aufgrund seiner ähnlichen Zinkfinger-DNA-Bindedomäne (Vyas *et al.*, 2001) auch an die gleichen *FLO11*-Promotorbereiche binden kann wie Nrg1. Nachdem nun die Bindung von HIS-GST-Nrg1 an verschiedene *FLO11*-Promotorbereiche untersucht und bestätigt werden konnte, galt es die noch offene Frage zu klären, ob HIS-GST-Nrg2 ebenfalls an die gleichen *FLO11*-Promotorbereiche wie HIS-GST-Nrg1 bindet. Dies wurde in parallelen Bindereaktionen durch die Inkubation von *FLO11*-BS2, *FLO11*-BS3 und *FLO11*-BS3M mit HIS-GST-Nrg1 bzw. HIS-GST-Nrg2 in kompetitiven Bandshift-Experimenten überprüft. Es bestätigten sich für HIS-GST-Nrg2 ähnliche Bindeeigenschaften wie für HIS-GST-Nrg1. Sowohl *FLO11*-BS2 als auch *FLO11*-BS3 konnten durch HIS-GST-Nrg2 komplexiert werden, wobei die Affinität zu *FLO11*-BS3 wesentlich höher und zu *FLO11*-BS3M extrem reduziert war. Die Bindeaffinität von Nrg2-HIS-GST betrug etwa das 0,3-fache der Nrg1-HIS-GST-Bindeaffinität an *FLO11*-BS3 (Abbildung 21).

### 2.2.3 *In vivo*-Funktion potentieller Nrg1-Bindemotive im *FLO11*-Promotor

Um festzustellen, wie die Genexpression bzw. -repression der in *in vitro* Bandshift-Experimenten untersuchten *FLO11*-Promotorfragmente durch Nrg1 *in vivo* reguliert wird, wurden Versuche mit *lacZ*-Reportergeneten durchgeführt.

Durch zwei Versuchsansätze wurde das Vorhandensein von URS (Upstream Repressing Sequences)- und UAS (Upstream Activating Sequences)-Elementen in den zu untersuchenden Promotorfragmenten berücksichtigt. Für einen Versuchsansatz wurden die Promotorfragmente (Tabelle 3) in das URS-Reporterplasmid pLG312n integriert (Abbildung 22). Als Reportergen enthält das Plasmid den Leserahmen des *E. coli lacZ*-Gens unter Kontrolle des *CYCI*-Promotors der Bäckerhefe *S. cerevisiae*, der zwei UAS-Elemente enthält, die zu einer starken Expression des Reportergens führen.



**Abbildung 22: Klonierung von *FLO11*-Promotorfragmenten in das URS-Reporterplasmid pLG312n und das UAS-Reporterplasmid pLG669ZΔ**

Fragmente des *FLO11*-Promotors, in denen bekannte (*FLO11*-BS1, -BS2, -BS3 und -BS4) und potentielle (*FLO11*-BS5, -BS6, -BS7 und BS-8) Nrg1-Bindemotive (gelb) vorliegen, wurden neben den Kontrollen (*FLO11*-BS3M und *ENAI*-BS1) mit 15 bp stromauf- bzw. stromabwärts flankierenden Bereichen (schwarz) über *Xho*I- und *Acc65*I-Schnittstellen in die MCS des URS-*lacZ*-Reporterplasmids pLG312n kloniert. Für die Konstruktion des UAS-*lacZ*-Reporterplasmids wurden die möglichen Nrg1-Bindestellen des *FLO11*-Promotors, bestehend aus dem Nrg1-Bindemotiv und den 15 bp stromauf- bzw. stromabwärts flankierenden Bereichen zusammen mit dem *CYC1*-Minimalpromotor (hellgrün) und den ersten 6 bp des *lacZ*-Leserahmens (weiß) aus dem pLG312n Reporterkonstrukt geschnitten und über die *Xho*I- und *Bam*HI-Schnittstellen in das pLG669ZΔ *lacZ*-Reporterplasmid integriert, das keine UAS (dunkelgrün) enthält.

Das Einbringen der zu testenden Promotorfragmente in die MCS stromabwärts der UAS-Elemente ermöglicht es, diese Fragmente auf das Vorhandensein möglicher URS-Elemente zu überprüfen. In einem zweiten Versuchsansatz wurden ebenfalls eventuell vorhandene UAS-Elemente berücksichtigt. Dazu wurden die in das Reporterplasmid pLG312n integrierten Promotorfragmente in das Reporterplasmid pLG669ZΔ übertragen, das im Unterschied zum Ausgangsplasmid keine UAS-Regionen enthält (Abbildung 22).

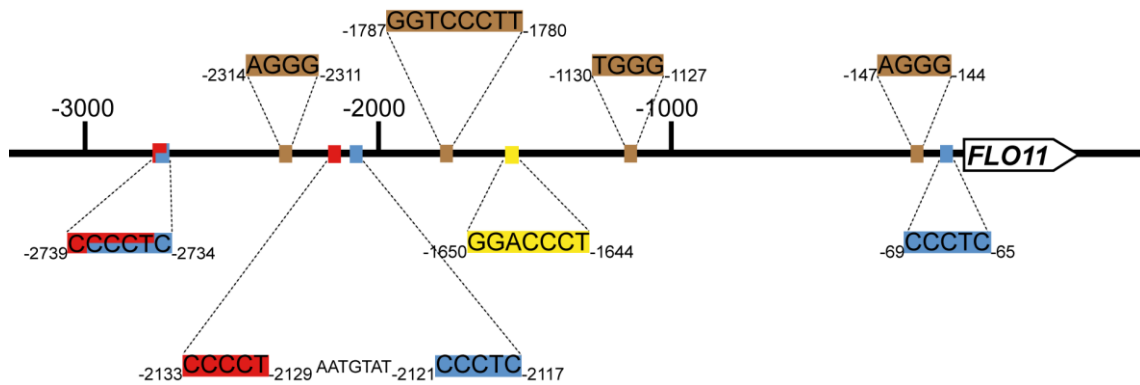
Für die Analysen wurden Oligonukleotide mit den benötigten Schnittstellen äquivalent der *in vitro* getesteten (vgl. Kapitel 2.2.2) *FLO11*-Promotorfragmente *FLO11*-BS1 (Kombination von Nrg1-BM I & II 5'-CCCCTC-3'), *FLO11*-BS2 (Nrg1-BM I 5'-CCCTC-3' und Nrg1-BM II 5'-CCCCT-3'), *FLO11*-BS3 (Nrg1-BM III 5'-GGACCCT-3'), *FLO11*-BS3M (Nrg1-BM III mut. 5'-GGATTCT-3', Negativkontrolle) und *FLO11*-

BS4 (Nrg1-BM II 5'-CCCCT-3') so generiert, dass nach der Aneinanderlagerung der beiden Einzelstränge die Enden des Doppelstrangs komplementär zu einer *XhoI*- bzw. *Acc65I*-Schnittstelle sind. Zusätzlich wurden vier weitere Promotorfragmente, *FLO11*-BS5, -BS6, -BS7 und -BS8, in die Analyse aufgenommen (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Getestete DNA-Fragmente für lacZ-Experimente mit Nrg1-Bindemotiven**

Die in den *lacZ*-Reportergenversuchen überprüften Promotorfragmente enthalten das Nrg1-Bindemotiv (farbig hinterlegt) und die 15 bp langen flankierenden Bereiche. Die Enden der Fragmente sind komplementär zu den *XhoI*- bzw. *Acc65I*- Restriktionsschnittstellen (hellblau). Fragment *FLO11*-BS1 mit den Nrg1-Bindemotiven I (5'-CCCTC-3', blau) und II (5'-CCCCT-3', rot) wurde aus den Oligonukleotiden 1-1n\_fw und 1-1n\_rev, Fragment *FLO11*-BS2 mit den Nrg1-BM I (5'-CCCTC-3', blau) und II (5'-CCCCT-3', rot) aus den Oligonukleotiden 2-1n\_fw und 2-1n\_rev hergestellt. Für das Fragment *FLO11*-BS3 mit dem Nrg1-BM III (5'-GGACCCT-3', gelb) wurden die Oligonukleotide 3-1n\_fw und 3-1n\_rev, für das Fragment *FLO11*-BS3M mit dem mutierten Nrg1-BM III (5'-GGATTCT-3', gelb) wurden die Oligonukleotide 3-2n\_fw und 3-2n\_rev verwendet. Fragment *FLO11*-BS4 mit dem Nrg1-Motiv IV (5'-CCCTC-3', blau) wurde aus den Oligonukleotiden 4-1n\_fw und 4-1n\_rev hergestellt und Fragment *ENA1*-BS1 mit dem Nrg1-Motiv IV (5'-AGACCCT-3', grün) aus den Oligonukleotiden 5-1\_fw und 5-1n\_rev. Die Fragmente *FLO11*-BS5 bis *FLO11*-BS8 enthalten potentielle Nrg1-Minimalbindemotive (braun): *FLO11*-BS5 mit Nrg1-BM V (5'-AGGG-3') aus den Oligonukleotiden bs5-1\_fw und bs5-1\_rev, *FLO11*-BS6 mit Nrg1-BM VI (5'-GGTCCCTT-3') aus den Oligonukleotiden bs6-1\_fw und bs6-1\_rev, *FLO11*-BS7 mit Nrg1-BM VII (5'-TGGG-3') aus den Oligonukleotiden bs7-1\_fw und bs7-1\_rev und *FLO11*-BS8 mit Nrg1-BM VIII (5'-AGGG-3') aus den Oligonukleotiden bs8-1\_fw und bs8-1\_rev. Die Nrg1-Bindemotive sind farbig hinterlegt.

| Name               | Sequenz  | Länge |
|--------------------|--|-------|
| <i>FLO11</i> -BS1  | 5' -TCGAGCTCTTTCCGTGAGTTCCCTTTCCTCTCACTGCACA-3'<br>3' -CGAGAAAGGCACTCAAGGGGAGAAGGAGAGTGACGTGTCATG-5'                     | 36 bp |
| <i>FLO11</i> -BS2  | 5' -TCGAGACTAGTCCTTTTGTCCCTAATGTATCCCTCATTTACACGTCGTA-3'<br>3' -CTGATCAGGAAAAACAGGGGATTACATAGGGAGTAAAGTATGGCAGCATCATG-5' | 47 bp |
| <i>FLO11</i> -BS3  | 5' -TCGAGGCTGTGCGGAAAAACGGACCCTAACACGAATGTGAATA-3'<br>3' -CCGACACGCCCTTTTGCCTGGGATTGTGCTTACACTTATCATG-5'                 | 37 bp |
| <i>FLO11</i> -BS3M | 5' -TCGAGGCTGTGCGGAAAAACGGATTCTAACACGAATGTGAATA-3'<br>3' -CCGACACGCCCTTTTGCCTAAGATTGTGCTTACACTTATCATG-5'                 | 37 bp |
| <i>FLO11</i> -BS4  | 5' -TCGAGTTCATCAGTTATTATCCCTCGTCATGTTGTGGTTCA-3'<br>3' -CAAGTAGTCAATAATAGGGAGCAGTACAACACCAAGTCATG-5'                     | 35 bp |
| <i>FLO11</i> -BS5  | 5' -TCGAGTACAGTTGAGCATCTCAGGGCCAGCGACAAATATAAA-3'<br>3' -CATGTCAACTCGTAGAGTCCCGTGCCTGTTTATATTTCATG-5'                    | 36 bp |
| <i>FLO11</i> -BS6  | 5' -TCGAGACCACCCCAAAACGGTCCCTTGCATGCATTGAGGTCA-3'<br>3' -CTGGTGGGTTTTGCCAGGGAACGTACGTAACCTCCAGTCATG-5'                   | 36 bp |
| <i>FLO11</i> -BS7  | 5' -TCGAGTATTTCCCTATCGAAGTGGGTCCTTTTGTCTTTAGA-3'<br>3' -CATAAAGGGATAGCTTACCCAGGAAAAACAGAAATTCATG-5'                      | 36 bp |
| <i>FLO11</i> -BS8  | 5' -TCGAGCAGTACAAGTTGTTGAAGGGTTCCCAATTGATAAAA-3'<br>3' -CGTCATGTTCAACAACCTCCCAAGGGTTAACTATTTTTCATG-5'                    | 36 bp |
| <i>ENA1</i> -BS1   | 5' -TCGAGGTTACATTGTGAGTACAGGGTCTTAAACATCGCCGTGCA-3'<br>3' -CCAATGTAACACTCATGTCCAGAAATTTGTAGCGGCACGTCATG-5'               | 38 bp |



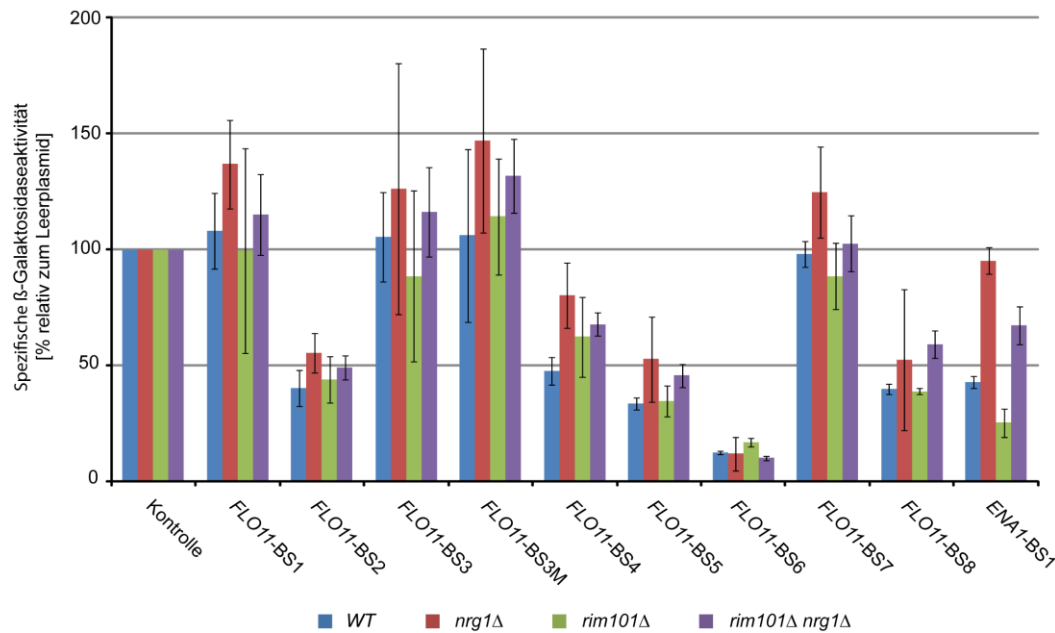
**Abbildung 23: *FLO11*-Promotorsequenz mit getesteten Nrg1-Bindemotiven**

Die schematische Darstellung des *FLO11*-Promotors zeigt die Lage der Nrg1-Bindemotive innerhalb des *FLO11*-Promotors. Die Farben der verschiedenen Bindemotive entsprechen den in den Bindesequenzen in Tabelle 3 verwendeten. Nrg1-BM I 5'-CCCTC-3' (blau) kommt 3-mal im *FLO11*-Promotor vor: -2738 bis -2734 (*FLO11*-BS1), -2121 bis -2117 (*FLO11*-BS2) und -69 bis -65 (*FLO11*-BS4). Nrg1-BM II 5'-CCCCT-3' (rot) kommt an zwei Stellen im *FLO11*-Promotor vor: -2739 bis -2735 (*FLO11*-BS1) und -2133 bis -2129 (*FLO11*-BS2). Nrg1-BM III 5'-GGACCCT-3' (*FLO11*-BS3) (gelb) kommt einmal innerhalb des Promotors vor: -1650 bis -1644. Potentielle Nrg1-Minimalbindemotive, die als zentrale Basen in der Nrg1-PWM vorkommen, sind in dieser Darstellung braun hinterlegt (Zhu *et al.*, 2009). Das potentielle Nrg1-BM V 5'-AGGG-3' kommt 2-mal im *FLO11*-Promotor vor: -2314 bis -2311 (*FLO11*-BS5) und -147 bis -144 (*FLO11*-BS8). Nrg1-BM VI 5'-GGTCCCTT-3' kann einmal an Stelle -1787 bis -1780 (*FLO11*-BS6) nachgewiesen werden. Nrg1-BM VII 5'-TGGG-3' ist nur an Position -1130 bis -1127 (*FLO11*-BS7) vorhanden. Die stromaufwärts des ATG-Startcodons liegende Sequenz von *FLO11* (Position -3017 bis -1) enthält also mehrere Nrg1-Bindemotive.

Diese Promotorfragmente tragen potentielle Nrg1-Minimalbindemotive, die als zentrale Basen in der Nrg1-PWM vorkommen (Abbildung 18) (Zhu *et al.*, 2009), von denen aber bisher nicht bekannt ist, ob sie alleine für die Vermittlung einer Nrg1-spezifischen Repression *in vivo* genügen. Als Positivkontrolle wurde das Fragment *ENAI*-BS1 verwendet. Dieses entspricht einem Bereich des *ENAI*-Promotors, der das Nrg1-Motiv IV (5'-AGACCCT-3') beinhaltet und durch Nrg1 *in vitro* gebunden werden kann (Platara *et al.*, 2006). Die Lokalisation der getesteten Nrg1-Bindemotive im *FLO11*-Promotor wird in Abbildung 23 wiedergegeben.

#### 2.2.4 Analyse von *FLO11*-Promotorfragmenten auf Nrg1-abhängige URS-Elemente

Um zu messen, ob die pLG312n-Reporterplasmide mit den eingebrachten *FLO11*-Promotorfragmenten (Tabelle 3) als URS wirken können und zu einer Nrg1-abhängigen Repression der Reportergenexpression führen, wurden diese Plasmide in den *S. cerevisiae*-Wildtypstamm, die *nrg1Δ*-, *rim101Δ*-Mutante und die *rim101Δ nrg1Δ*-Doppelmutante transformiert.



**Abbildung 24: lacZ-Reportergen-Versuch mit Fragmenten des *FLO11*-Promotors in einem URS-Reporter-plasmid**

Die Plasmide BHUM1243 (pLG312n), BHUM1444 (pLG312n\_*FLO11*-BS1), BHUM1447 (pLG312n\_*FLO11*-BS2), BHUM1448 (pLG312n\_*FLO11*-BS3), BHUM1450 (pLG312n\_*FLO11*-BS3M), BHUM1452 (pLG312n\_*FLO11*-BS4), BHUM1631 (pLG312n\_*FLO11*-BS5), BHUM1633 (pLG312n\_*FLO11*-BS6), BHUM1635 (pLG312n\_*FLO11*-BS7), BHUM1637 (pLG312n\_*FLO11*-BS8) und BHUM1454 (pLG312n\_*ENA1*-BS1) wurden in die *S. cerevisiae*-Stämme WT (YHUM0909, blau), *nrg1*Δ (YHUM1459, rot), *rim101*Δ (YHUM1461, grün) und *rim101*Δ *nrg1*Δ (YHUM1522, violett) transformiert. Die Stämme wurden in YNB mit 2 % Glucose bis zu einer OD<sub>600</sub> = 1 inkubiert und geerntet. Danach wurde die spezifische β-Galaktosidaseaktivität des Proteinextrakts ermittelt. Die Aktivität des Kontrollplasmids wurde für jeden Stamm gleich 100 % gesetzt. Gezeigt werden die Mittelwerte der Messungen von drei unabhängigen Transformanten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der drei Messungen. (Teile, *FLO11*-BS1 bis -BS4, aus der betreuten Dipl.-Arbeit (Schäfer, 2009)).

Wie erwartet vermittelt das Nrg1-Referenzfragment *ENA1*-BS1 aus dem *ENA1*-Promotor die deutlichste Nrg1-abhängige Regulation der Reportergenexpression (Abbildung 24, *ENA1*-BS1). Im Wildtypstamm konnte eine Repression von 57 % im Vergleich zum Kontrollplasmid gemessen werden, wohingegen die β-Galaktosidaseaktivität im *nrg1*-Deletionsstamm 95 % betrug. Die erhöhte Nrg1-Konzentration in einer *rim101*-Deletionsmutante senkte die β-Galaktosidaseaktivität auf nur 25 % des Niveaus des Kontrollplasmids. Für die *rim101*Δ *nrg1*Δ-Doppelmutante ergab sich eine Erhöhung der β-Galaktosidaseaktivität auf 67 %. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass in der Doppelmutante neben Nrg1 noch weitere, durch Rim101 negativ regulierte Transkriptionsrepressoren an das getestete Promotorfragment mit der *ENA1*-Bindesequenz binden können.

Alle weiteren getesteten Promotorfragmente lassen eine Klassifizierung in zwei Gruppen zu. Gruppe 1 beinhaltet Reporterplasmide, die eine um etwa <50%ige Verringerung der β-Galaktosidaseaktivität im Vergleich zu den Kontrollplasmiden in

den getesteten Deletionsstämmen aufwiesen, und umfasst die getesteten Plasmide pLG312n\_*FLO11*-BS2, -BS4 (leicht höher), -BS5, -BS6 und -BS8. Bei diesen Reporterkonstrukten führte eine Deletion von *NRG1*, mit Ausnahme von pLG312n\_*FLO11*-BS6, zu einer gesteigerten  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität im Vergleich zum Wildtypstamm. Die Deletion von *RIM101* zeigt nur für das getestete Reporterplasmid pLG312n\_*FLO11*-BS4 eine leichte Erhöhung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität, die ansonsten bei allen anderen Reporterplasmiden dieser Gruppe etwa auf dem Niveau des Wildtypstamms bleibt. Bei einer streng durch Rim101 kontrollierten Transkriptionsrepressorregulation der in dieser Gruppe zusammengefassten Reporterkonstrukte wäre hier jedoch eher eine Abnahme der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität zu erwarten gewesen. Die kombinierte Deletion von *RIM101* und *NRG1* erhöhte hingegen, mit Ausnahme von pLG312n\_*FLO11*-BS6, die Reporterexpression, die jedoch geringer als in der *nrg1*-Deletionsmutante ausfiel. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass in den getesteten Promotorfragmenten *FLO11*-BS2, -BS4, -BS5, und -BS8 außer Nrg1 noch weitere Transkriptionsrepressoren binden können, die durch Rim101 negativ reguliert werden, ähnlich wie bei dem Kontrollplasmid *ENAI*-BS1.

Gruppe 2 umfasst alle Reporterplasmide, deren  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität etwa der des Kontrollplasmids entsprach oder leicht erhöht war. Eine Erklärung kann das Vorhandensein zusätzlicher UAS-Elemente in den getesteten *FLO11*-Promotorfragmenten sein, das zu einer Überschattung der potentiellen URS-Aktivität führte. Zu dieser Gruppe gehören die Reporterplasmide pLG312n\_*FLO11*-BS1, -BS3, -BS3M und -BS7.

Alle Promotorfragmente der in Gruppe 2 enthaltenen Reporterplasmide haben mit den in Gruppe 1 zusammengefassten ein ähnliches Regulationsmuster gemein. Auch hier ließ sich in der *nrg1*-Deletionsmutante eine  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität nachweisen, die stärker ausfiel als in der *rim101* $\Delta$  *nrg1* $\Delta$ -Doppelmutante, wobei beide Mutanten die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität des Wildtyps übertrafen. Eine Rim101-abhängige Reporterexpression lässt sich aufgrund der relativ großen Standardabweichungen nicht eindeutig nachweisen, könnte aber bei den Plasmiden pLG312n\_*FLO11*-BS1, -BS3 und -BS7 vorhanden sein.

Zusammenfassend zeigt die Analyse der verschiedenen *FLO11*-Promotorfragmente, dass keines ein so deutliches Nrg1-abhängiges Regulationsmuster aufweist wie das

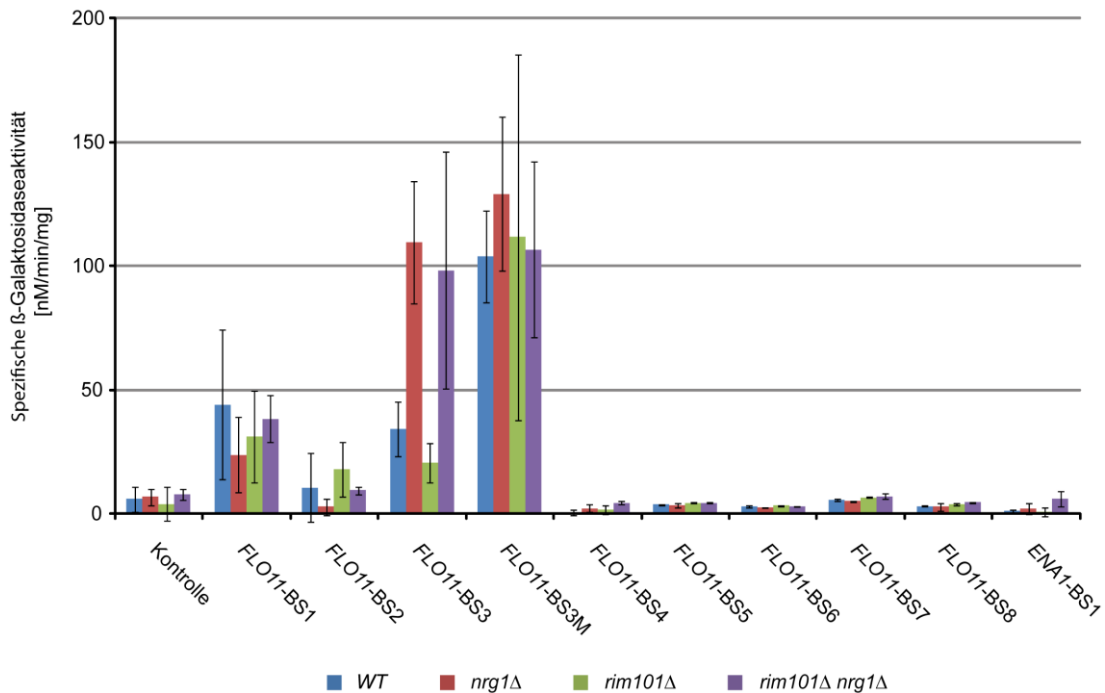
*ENAI*-Promotorfragment. Mit Ausnahme des Reporterplasmids pLG312n\_*FLO11*-BS6 ist sowohl bei den Gruppe 1- als auch Gruppe 2-Reporterplasmiden eine Nrg1- und Rim101-abhängige Regulation der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität nachweisbar. Die Rim101-abhängige Regulation der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität ließ sich jedoch nur in der *nrg1* $\Delta$  *rim101* $\Delta$ -Doppelmutante nachweisen, was für das Vorhandensein weiterer Transkriptionsrepressoren spricht, die möglicherweise in Nrg2 oder einer Kombination von Nrg2 mit Smp1 gefunden werden können. Die Bindeaffinität von Nrg2 an bekannte Nrg1-Sequenzen wurde in Kapitel 2.2.2 beschrieben und ist bei Nrg2 schwächer als bei Nrg1 ausgeprägt. Eine Rim101-abhängige *SMP1* Repression ist bekannt (Lamb & Mitchell, 2003).

### 2.2.5 Analyse von *FLO11*-Promotorfragmenten auf Nrg1-kontrollierte UAS-Elemente

Die in Kapitel 2.2.4 analysierten Promotorbereiche *FLO11*-BS1, -BS3, -BS3M und -BS7 führten in dem Reporterplasmid pLG312n, das für die Analyse von URS-Elementen konstruiert worden ist und hierfür eine konstitutiv vorhandene *lacZ*-Grundexpression aufweist, zu höheren  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten, als sie für das Kontrollplasmid ermittelt werden konnten. Diese Effekte deuten auf das Vorhandensein von UAS-Regionen in den getesteten Promotorfragmenten hin. Um zu vermeiden, dass die potentiell vorhandene URS-Aktivität neben der nachgewiesenen UAS-Aktivität der Promotorfragmente *FLO11*-BS1, -BS3, -BS3M und -BS7 durch eine konstitutive *lacZ*-Grundexpression des Reporterplasmids (pLG312n) überschattet wird, wurde ein Versuchsansatz gewählt, in dem die Promotorfragmente in ein Reporterplasmid (pLG669Z $\Delta$ ) eingebracht werden, das keine UAS-Region enthält und das *lacZ*-Reporter gen lediglich unter die Kontrolle des basalen *CYCI*-Promotor stellt (Abbildung 22). Die resultierenden Reporterplasmide mit den in Tabelle 3 beschriebenen *FLO11*-Promotorfragmenten wurden in den *S. cerevisiae*-Wildtypstamm, die *nrg1* $\Delta$ -, *rim101* $\Delta$ -Mutante und die *rim101* $\Delta$  *nrg1* $\Delta$ -Doppelmutante transformiert und die resultierende  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität bestimmt.

Die Analyse ergab, dass das Einbringen der Promotorfragmente *FLO11*-BS4, -BS5, -BS6, -BS7 und -BS8, ebenso wie *ENAI*-BS1, zu einer basalen *lacZ*-Expression des Reporterplasmids führt, die dem Expressionsniveau des

Kontrollplasmids entspricht. Die *FLO11*-Promotorfragmente *FLO11*-BS1, -BS2, -BS3 und -BS3M scheinen UAS-Elemente zu tragen, an die ein oder mehrere Transkriptionsaktivatoren binden können, wodurch die Reporterexpression stimuliert wird (Abbildung 25).



**Abbildung 25: *lacZ*-Reporter-gen-Versuch mit Fragmenten des *FLO11*-Promotors in einem UAS-Reporter-plasmid**

Die Plasmide BHUM1556 (pLG669ZΔ<sub>leer</sub>), BHUM1544 (pLG669ZΔ<sub>*FLO11*-BS1</sub>), BHUM1546 (pLG669ZΔ<sub>*FLO11*-BS2</sub>), BHUM1548 (pLG669ZΔ<sub>*FLO11*-BS3</sub>), BHUM1550 (pLG669ZΔ<sub>*FLO11*-BS3M</sub>), BHUM1552 (pLG669ZΔ<sub>*FLO11*-BS4</sub>), BHUM1654 (pLG669ZΔ<sub>*FLO11*-BS5</sub>), BHUM1656 (pLG669ZΔ<sub>*FLO11*-BS6</sub>), BHUM1658 (pLG669ZΔ<sub>*FLO11*-BS7</sub>), BHUM1660 (pLG669ZΔ<sub>*FLO11*-BS8</sub>) und BHUM1554 (pLG669ZΔ<sub>*ENA1*-BS1</sub>) wurden in die *S. cerevisiae*-Stämme WT (YHUM0909, blau), *nrg1*Δ (YHUM1459, rot), *rim101*Δ (YHUM1461, grün), *rim101*Δ *nrg1*Δ (YHUM1522, violett) transformiert. Die Stämme wurden in YNB mit 2 % Glucose bis zu einer OD<sub>600</sub> = 1 inkubiert, geerntet und die spezifische β-Galaktosidaseaktivität des Proteinextrakts ermittelt. Gezeigt werden die Mittelwerte der Messungen von drei unabhängigen Transformanden. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der drei Messungen. (Teile, *FLO11*-BS1 bis -BS4, aus der betreuten Dipl.-Arbeit (Schäfer, 2009)).

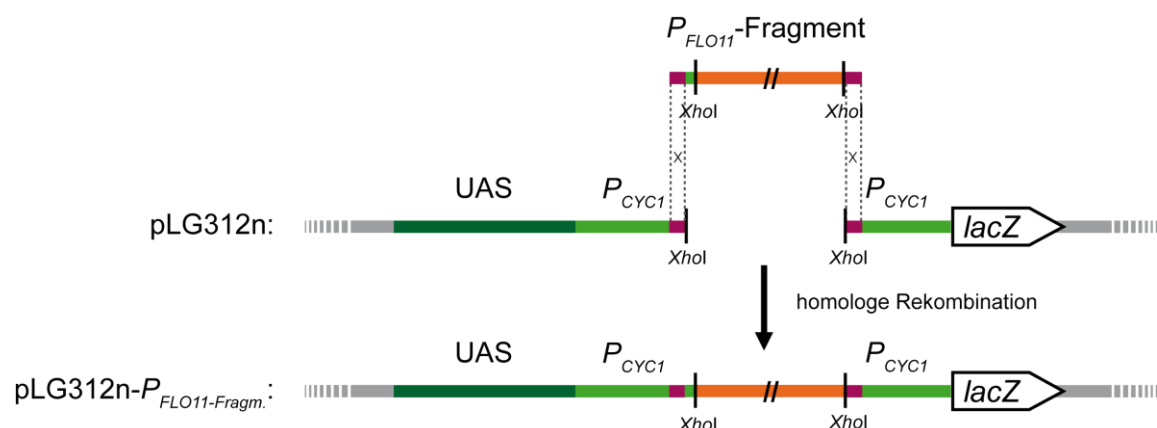
Durch die Verwendung dieses Reporterplasmidsets konnte die Nrg1-abhängige Kontrolle der UAS-Aktivität des *FLO11*-BS3-Promotorfragments durch den Vergleich der Reporterexpression zwischen dem Wildtypstamm und den *nrg1*Δ-, *rim101*Δ-Mutanten und der *rim101*Δ *nrg1*Δ-Doppelmutante gezeigt werden. Eine das pLG669ZΔ<sub>*FLO11*-BS3</sub>-Reporterplasmid tragende *nrg1*Δ-Mutante wies eine β-Galaktosidaseaktivität von etwa 110 nM/min/mg auf. Diese Aktivität war in einem Wildtypstamm 3-fach, in einer *rim101*-Deletionsmutante sogar 5-fach geringer, während die β-Galaktosidaseaktivität in einer *rim101*Δ *nrg1*Δ-Doppelmutante einen Wert von etwa 98 nM/min/mg erreichte, also fast die Aktivität einer *nrg1*Δ-Mutante,



wobei hier die große Standardabweichung berücksichtigt werden muss. Dies lässt eine überwiegend Nrg1-abhängige Regulation vermuten und deutet auf einen nur geringen Einfluss weiterer Transkriptionsrepressoren auf dieses Bindemotiv hin. Als Gegenprobe konnte für das Reporterplasmid pLG669ZΔ\_FLO11-BS3M mit dem mutierten Nrg1-Bindemotiv in allen getesteten Stammhintergründen eine  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität von über 100 nM/min/mg nachgewiesen werden. Eine Mutation des Nrg1-BM III 5'-GGACCCT-3' entkoppelte dieses Bindemotiv von seiner Nrg1-abhängigen Repression, wie durch die Analyse der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität des Reporterplasids pLG669ZΔ\_FLO11-BS3M gezeigt wurde. Im Gegensatz zu FLO11-BS3 enthalten die Promotorfragmente FLO11-BS1 und -BS2 UAS-Elemente, die nicht negativ durch Nrg1 reguliert sind (Abbildung 25).

### 2.2.6 Analyse des FLO11-Promotors auf URS-Elemente in Deletionsstämmen des Rim101-Signalwegs

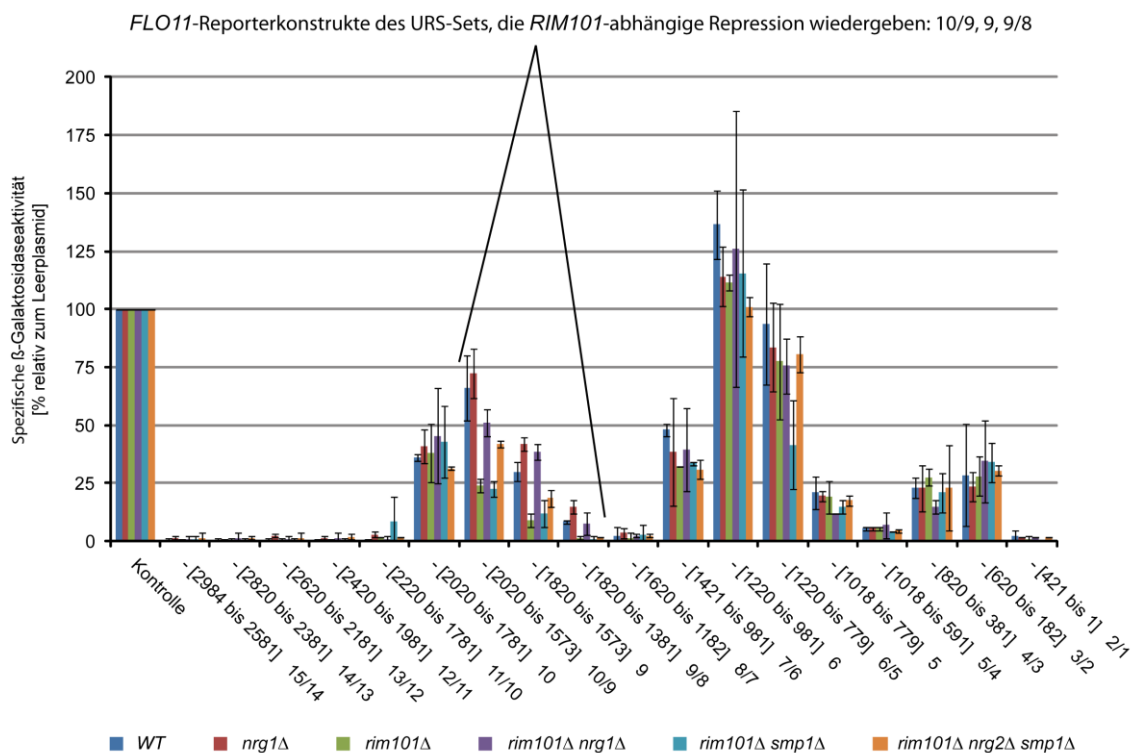
Um die mögliche indirekte Regulation des FLO11-Promotors durch die Transkriptionsrepressoren Nrg1, Nrg2 und Smp1 weiter zu bestimmen und entsprechende regulatorische Bereiche besser einzugrenzen, wurde eine Sammlung mit FLO11-Reporterplasmiden verwendet, die im Rahmen einer von mir betreuten Diplomarbeit (Mark, 2008) hergestellt wurde.



**Abbildung 26: Klonierung von FLO11-Promotorfragmenten in das URS-Reporterplasmid pLG312n**

Fragmente des FLO11-Promotors wurden aus der UAS-Plasmidsammlung (Braus *et al.*, 2003; Rupp *et al.*, 1999) amplifiziert und durch homologe Rekombination (lila: homologe Bereiche) in die XhoI geschnittene MCS des CYC1-Promotors (hellgrün), der zwei UAS-Elemente (dunkelgrün) enthält, eingebracht. Das lacZ-Reporterplasmid pLG312n enthält einen Ampicillin-Marker zur Selektion in *E. coli* und einen URA3-Marker zur Selektion in *S. cerevisiae*. Die Expression des lacZ-Reportergens wird durch den CYC1-FLO11-Hybridpromotor reguliert.

Etwa 440 bp und 220 bp große Teilstücke des ca. 3 kb großen *FLO11*-Promotors aus einer bereits vorhandenen Plasmidsammlung, die zum Testen auf UAS-Elemente im *FLO11*-Promotor verwendet wird (Braus *et al.*, 2003; Rupp *et al.*, 1999), wurden hierzu mittels homologer Rekombination in die MCS des URS-Reporterplasmids pLG312n (Rothfels *et al.*, 2005) eingebracht. Als Reportergen beinhaltet das Plasmid den Leserahmen des *E. coli lacZ*-Gens unter Kontrolle des *CYC1*-Promotors der Bäckerhefe *S. cerevisiae*, der zwei zu einer starken Expression des Reportergens führende UAS-Elemente enthält (Abbildung 26).



**Abbildung 27: *lacZ*-Reporter-gen-Versuch mit Fragmenten des *FLO11*-Promotors in dem URS-Reporterplasmid pLG312n**

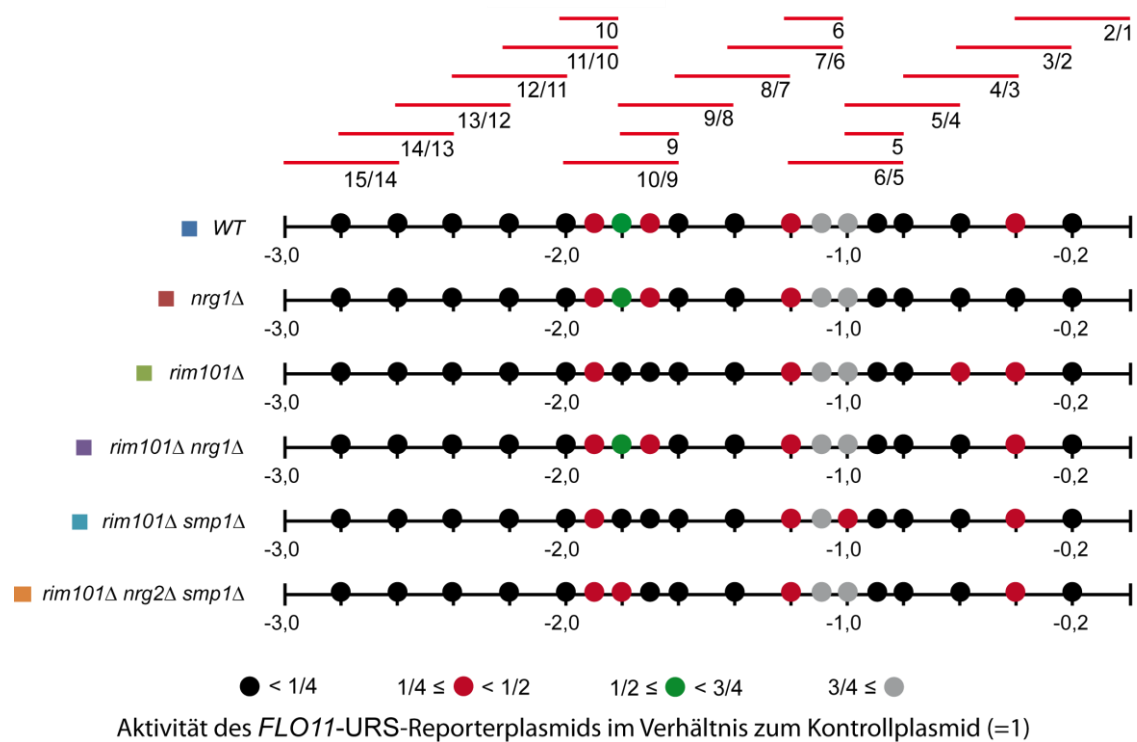
Die Plasmide BHUM1243 (pLG312n), BHUM1266 (pLG312n\_2/1), BHUM1267 (pLG312n\_3/2), BHUM1268 (pLG312n\_4/3), BHUM1269 (pLG312n\_5/4), BHUM1270 (pLG312n\_5), BHUM1271 (pLG312n\_6/5), BHUM1272 (pLG312n\_6), BHUM1273 (pLG312n\_7/6), BHUM1274 (pLG312n\_8/7), BHUM1275 (pLG312n\_9/8), BHUM1276 (pLG312n\_9), BHUM1277 (pLG312n\_10/9), BHUM1278 (pLG312n\_10), BHUM1279 (pLG312n\_11/10), BHUM1280 (pLG312n\_12/11), BHUM1281 (pLG312n\_13/12), BHUM1282 (pLG312n\_14/13) und BHUM1283 (pLG312n\_15/14) wurden in die *S. cerevisiae*-Stämme WT (YHUM0909, blau), *nrg1*Δ (YHUM1459, rot), *rim101*Δ (YHUM1461, grün), *rim101*Δ *nrg1*Δ (YHUM1522, violett), *rim101*Δ *smp1*Δ (YHUM1524, türkis) und *rim101*Δ *nrg2*Δ *smp1*Δ (YHUM1576, orange) transformiert. Die Stämme wurden in YNB bis zu einer OD<sub>600</sub> = 1 inkubiert, geerntet und die spezifische  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität des Proteinextrakts ermittelt. Die Aktivität des Kontrollplasmids wurde für jeden Stamm gleich 100 % gesetzt. Gezeigt werden die Mittelwerte der Doppelbestimmungen von zwei unabhängigen Transformanden. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Messungen wieder. Markiert sind die *FLO11*-Promotorfragmente (10, 10/9 und 9), die eine *RIM101*-abhängige Repression vermitteln.

Die *FLO11*-URS-Reporterplasmide wurden in *rim101*-, *rim101 nrg1*-, *rim101 nrg2 smp1*-, *rim101 smp1*- und *nrg1*-Deletionsstämmen sowie als Kontrolle in den Wildtypstamm transformiert. Es ließ sich so gezielt untersuchen, ob die in das pLG312n-Reporterplasmid eingebrachten *FLO11*-Promotorfragmente als URS fungieren können und zu einer, von den Transkriptionsrepressoren Nrg1-, Nrg2- und Smp1-abhängigen Repression der Reporterexpression führen (Abbildung 27).

Die erhobene relative  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität für die einzelnen *FLO11*-URS-Reporterplasmide ermöglicht eine Einteilung in vier Gruppen. Es gibt drei Gruppen mit *RIM101*-unabhängiger Repression (Abbildung 27): Gruppe 1 umfasst Reporterplasmide, die eine sehr starke Repression auf etwa 1/10 der relativen Aktivität der Kontrollplasmide vermitteln: 15/14, 14/13, 13/12, 12/11, 11/10, 8/7, 5/4 und 2/1. Gruppe 2 beinhaltet Reporterplasmide, die zu einer relativen  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität von etwa 20-50 % der Kontrollen führen: 7/6, 5, 4/3 und 3/2. Gruppe 3 enthält die Reporterplasmide 6 und 6/5, die nur eine sehr schwache Repression bzw. leichte Aktivierung bewirken. Besonderes Augenmerk richtet sich in diesem Versuch jedoch auf Gruppe 4, die die Reporterplasmide 10/9, 9 und 9/8 umfasst und einen Bereich von -2020 bp bis -1381 bp stromaufwärts vom *FLO11*-Expressionsstart abdeckt (Abbildung 27). Diese *FLO11*-Promotorfragmente vermitteln eine *RIM101*-abhängige Repression, die in einer *rim101Δ nrg1Δ*-Doppelmutante stärker als in einer *rim101Δ nrg2Δ smp1Δ*-Dreifachmutante ausgeprägt ist, wohingegen die relative  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität im *nrg1Δ*-Stamm im Vergleich zum Wildtyp zunimmt. Die über die Reporterplasmide 10/9, 9 und 9/8 vermittelte *RIM101*-abhängige Repression wird in einer *rim101Δ smp1Δ*-Doppelmutante nicht supprimiert.

Da die untersuchten *FLO11*-Promotorfragmente überlappen, wurden die jeweiligen relativen  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten der verwendeten *FLO11*-URS-Reporterplasmide für die einzelnen Deletionsstämmen in einer Grafik in den *FLO11*-Promotor integriert (Abbildung 28). Durch diese schematische Aufbereitung der Ergebnisse lässt sich im Bereich von -1600 bp bis -1900 bp stromaufwärts vom ATG ein Bereich mit *RIM101*-abhängiger Repression eingrenzen. Diese Repression wird in einer *rim101Δ nrg1Δ*-Doppelmutante stärker als in einer *rim101Δ nrg2Δ smp1Δ*-Dreifachmutante supprimiert, wie durch die Punktmatrix bei -1700 bp und -1800 bp dargestellt wird. Dieses Ergebnis geht mit dem Befund einher, der durch die *FLO11*-Promotoranalyse auf Nrg1-Bindemotive gewonnen wurde (Abbildung 19 A). Danach befindet sich in

dem Bereich -1650 bp bis -1644 bp das Nrg1-BM III 5'-GGACCCT-3' (Harbison *et al.*, 2004), so dass die Vermutung naheliegt, dass dieses Nrg1-Bindemotiv von besonderer Bedeutung für die *RIM101*-abhängige *FLO11*-Repression ist. Durch dieses Experiment kann außerdem bestätigt werden, dass Nrg2 nicht nur an dieses Nrg1-Bindemotiv bindet, was bereits zuvor durch die Bandshift-Experimente gezeigt wurde, sondern auch funktionell ist, da die für eine *rim101Δ nrg2Δ smp1Δ*-Dreifachmutante bestimmte relative  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität im Vergleich zu einer *rim101Δ*-Mutante zunimmt und im *FLO11*-Promotor bisher kein Bindemotiv für den Transkriptionsrepressor Smp1 nachgewiesen werden konnte, zumal die relative  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität einer *rim101Δ smp1Δ*-Doppelmutante auf dem Niveau einer *rim101Δ*-Mutante liegt.

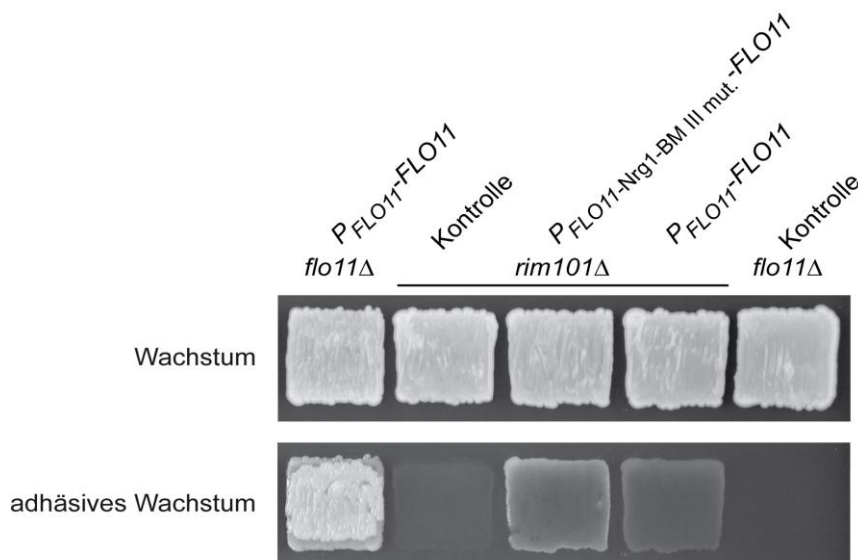


**Abbildung 28: Schematische Darstellung der relativen Aktivität verschiedener *FLO11*-Promotorbereiche im URS-Reporterplasmid pLG312n in Deletionsstämmen des Rim101-Signalwegs**

Die farbig markierten Punkte (schwarz: kleiner  $\frac{1}{4}$ , rot:  $\frac{1}{4}$  bis kleiner  $\frac{1}{2}$ , grün:  $\frac{1}{2}$  bis kleiner  $\frac{3}{4}$ , grau: größer gleich  $\frac{3}{4}$ ) geben die relative Aktivität verschiedener *FLO11*-Promotorbereiche im URS-Reporterplasmid pLG312n im WT-Stamm und den *nrg1*-, *rim101*-, *rim101 nrg1*-, *rim101 smp1*- und *rim101 nrg2 smp1*-Deletionsstämmen an. Die Punkte sind für jeden Stamm auf einer Linie in einer Position angeordnet, welche dem Fragment entspricht (oberhalb angeordnet), das die Repression vermittelte.

### 2.2.7 Die Nrg1- und Nrg2-abhängige *FLO11*-Repression wird nicht allein über das Bindemotiv GGACCCT reguliert

Um festzustellen, ob der Adhäsionsverlust einer *rim101*-Deletionsmutante Nrg1- und Nrg2-abhängig hauptsächlich über das Bindemotiv 5'-GGACCCT-3' (Nrg1-BM III) vermittelt wird, das im getesteten *FLO11*-BS3-Fragment in den kompetitiven EMSA-Analysen die stärkste Nrg1- und Nrg2-Bindeaffinität (vgl. Kapitel 2.2.2) und in den *lacZ*-Reportergergen-Versuchen (Abbildung 25 und Abbildung 27) die stärkste Nrg1- und Nrg2-abhängige Repression zeigte, wurde das Bindemotiv 5'-GGACCCT-3' im *FLO11*-Promotor mittels Quick-Change Mutagenese zu 5'-GGATTCT-3' mutiert.



**Abbildung 29: In saurem Milieu wird Nrg1- und Nrg2-abhängige *FLO11*-Repression nicht allein über das Bindemotiv GGACCCT reguliert.**

Die Stämme wurden für 3 Tage auf SC-Platten (pH 5,5) inkubiert und vor (Wachstum) und nach (adhäsives Wachstum) einer Waschprozedur fotografiert. Verwendete Stämme: *flo11*Δ (YHUM0924) mit Plasmid BHUM0778 (*P<sub>FLO11</sub>*-*FLO11*, *CEN*, *URA3*), *flo11*Δ (YHUM0924) mit Plasmid BHUM2445 (*CEN*, *URA3*), *rim101*Δ (YHUM1461) mit Plasmid BHUM0778 (*P<sub>FLO11</sub>*-*FLO11*, *CEN*, *URA3*), *rim101*Δ (YHUM1461) mit Plasmid BHUM1628 (*P<sub>FLO11</sub>*-Nrg1-BM III mut.-*FLO11*, *CEN*, *URA3*) und *rim101*Δ (YHUM1461) mit dem Plasmid BHUM2445 (*CEN*, *URA3*).

Für einen Adhäsionsversuch wurde *FLO11* von einem entsprechend mutierten bzw. nativen *FLO11*-Promotor von einem *CEN*-Plasmid aus in einem *rim101*-Deletionsstamm exprimiert. Wenn die Nrg1-abhängige *FLO11*-Repression also hauptsächlich über das Nrg1-BM III erfolgt, sollte eine Mutation dieses Bindemotivs in einem adhäsiven *rim101*Δ-Phänotyp resultieren. Als Kontrollstamm diente eine *flo11*-Deletionsmutante, deren Phänotyp durch die Expression von *FLO11* unter Kontrolle seines nativen Promotors von einem *CEN*-Plasmid kompensiert wurde. Als Kontrollplasmide wurde für beide Stämme der Ausgangsvektor ohne Insertion

verwendet. Die Stämme wurden auf SC-Agarplatten (pH 5,5) ausgestrichen und nach 3 Tagen einem Waschtest unterzogen.

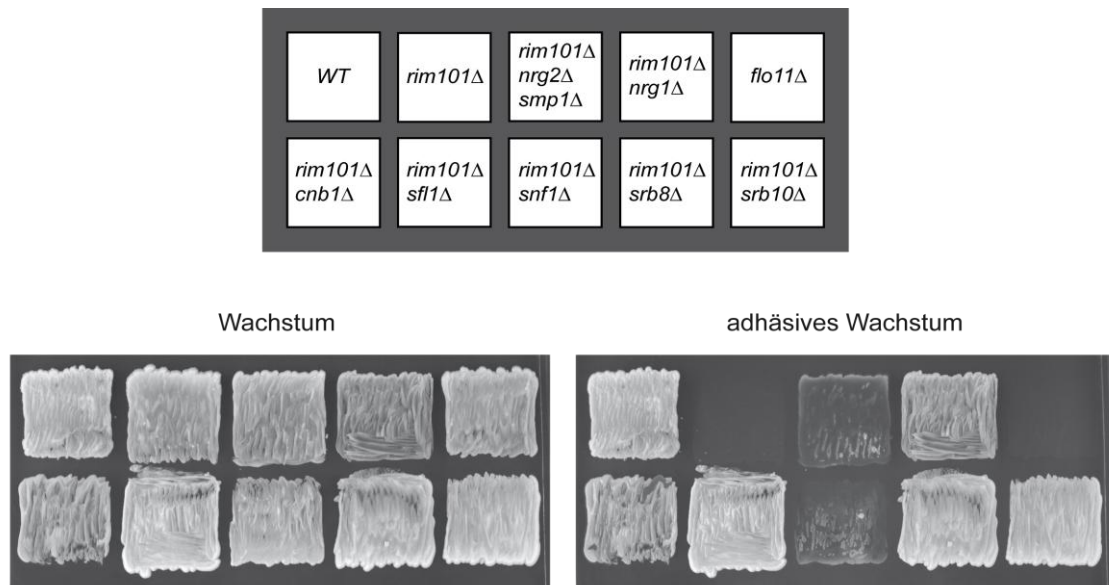
Dieser Versuch zeigte, dass die Mutation des Nrg1-BM III (5'-GGACCCT-3') im *FLO11*-Promotor nicht ausreicht, um eine Nrg1- und Nrg2-abhängige *FLO11*-Repression im *rim101*-Deletionsstamm zu supprimieren, was nur in einer sehr schwachen Adhäsion resultiert (Abbildung 29). Qualitativ war diese Adhäsion jedoch etwas stärker als die eines *rim101*-Deletionsstamms, in dem *FLO11* von seinem nativen Promotor von einem *CEN*-Plasmid aus exprimiert wurde. Zusammenfassend kann die *in vivo* Regulation des *FLO11*-Promotors durch Nrg1 und Nrg2 nicht allein einer Schlüsselbindestelle zugewiesen werden. Vielmehr ist sie wesentlich komplexer und wird wahrscheinlich kooperativ über mehrere Nrg1-Bindestellen im *FLO11*-Promotor realisiert.

### 2.3 Verbindung zwischen Rim101 und anderen Regulatoren von *FLO11*

Neben den bereits in Kapitel 2.1.2 beschriebenen epistatischen Analysen der Auswirkung von Transkriptionsfaktoren des Rim101-Signalwegs auf die Flo11 vermittelte Adhäsion wurden nun analog weitere Gene für zentrale Komponenten aus anderen Signalwegen und einem dem RNA-Polymerase II-Mediorkomplex assoziierten Srb8-11-Komplex in Kombination mit *RIM101* deletiert. Es sollte überprüft werden, ob der nicht adhäsive Phänotyp einer *rim101Δ*-Mutation in Doppelmutanten, die eine Deletion von *RIM101* in Kombination mit einer *cnb1-*, *sfl1-*, *snf1-*, *srb8-* bzw. *srb10*-Deletion tragen, supprimiert wird.

Mit einem Waschtest wurde dann die Adhäsionsfähigkeit der hergestellten Deletionsmutanten an die Agar-Oberfläche untersucht. Die verwendeten Stämme wurden auf SC+Ura-Platten (pH 5,5) ausgestrichen und nach 6 Tagen einem Waschtest unterzogen (Abbildung 30). Wie bereits zuvor beschrieben wurde (vgl. Kapitel 2.1.2), zeigten der *flo11Δ*- und der *rim101Δ*-Stamm keinen adhäsiven Phänotyp. Eine *nrg1Δ*-Mutation supprimierte den nicht adhäsiven Phänotyp einer *rim101Δ*-Mutation auch auf dem verwendeten SC+Ura-Agar, wohingegen eine *nrg2Δ smp1Δ*-Doppelmutation den Phänotyp einer *rim101Δ*-Mutation nur schwach supprimieren konnte. Der SC+Ura-Agar unterscheidet sich von dem zuvor verwendeten YNB+Ura-Agar durch die

zusätzliche Supplementation mit einem AS-Mix, der das Hefewachstum positiv unterstützen soll. Die zusätzliche Gabe von Aminosäuren scheint hier jedoch die Adhäsion der *rim101Δ nrg2Δ smp1Δ*-Dreifachmutante auf bisher ungeklärte Weise negativ zu beeinflussen.



**Abbildung 30: Regulation des adhäsiven Wachstums durch Rim101 und andere Regulatoren von *FLO11***

Die Stämme wurden für 6 Tage auf SC+Ura-Platten (pH 5,5) inkubiert und vor (Wachstum) und nach (adhäsives Wachstum) einer Waschprozedur fotografiert. Die *flo11* (YHUM0924)- und *rim101* (YHUM1461)-Deletionsmutanten zeigen einen nicht adhäsiven Phänotyp. Der nicht adhäsive Phänotyp einer *rim101* (YHUM1461)-Mutation kann in einer *rim101Δ nrg1Δ* (YHUM1522)-, *rim101Δ cnb1Δ* (YHUM1596)-, *rim101Δ sfl1Δ* (YHUM1593)-, *rim101Δ srb8Δ* (YHUM1602)- und *rim101Δ srb10Δ* (YHUM1654)-Doppelmutante supprimiert werden. Eine nur schwache Suppression des nicht adhäsiven Phänotyps einer *rim101Δ*-Mutation erfolgt in der *rim101Δ nrg2Δ smp1Δ* (YHUM1576)-Dreifachmutante und der *rim101Δ snf1Δ* (YHUM1814)-Doppelmutante.

Interessanterweise scheint eine bisher unbekannte Quervernetzung zwischen dem Rim101- und dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Calcineurin-Crz1-Signalweg zu existieren. So kann der nicht adhäsive Phänotyp einer *rim101Δ*-Mutation in einer *rim101Δ cnb1Δ*-Doppelmutante supprimiert werden. Cnb1 ist die regulatorische Untereinheit der heterodimeren Serin-/Threonin-Proteinkinase Calcineurin, die das zentrale Element des  $\text{Ca}^{2+}$ -Calcineurin-Crz1-Signalwegs bildet, der Toleranz gegenüber alkalischem pH-Milieu vermittelt (Cyert, 2003; Mendoza *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 1993; Serrano *et al.*, 2002). Bisher war ein gemeinsamer Einfluss beider Signalwege auf die Regulation der *FLO11*-Expression unbekannt. Die genaue Analyse der Quervernetzung beider Signalwege sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein, da in *S. cerevisiae* sowohl der Rim101-Signalweg als auch der  $\text{Ca}^{2+}$ -Calcineurin-Crz1-Signalweg als Sensorsystem für alkalischen pH beschrieben wird (Kullas *et al.*, 2007; Serrano *et al.*, 2002).

Sfl1 ist als transkriptioneller Repressor der Flo11-abhängigen Flokkulation bekannt (Robertson *et al.*, 2000; Robertson & Fink, 1998) und wird durch die katalytische Untereinheit Tpk2 der Proteinkinase A des Ras2-/cAMP-Signalwegs inhibiert, die in Gegenwart von Glucose, Ammonium, Aminosäuren und Phosphat aktiv ist (Conlan & Tzamarias, 2001; Pan & Heitman, 2002) (vgl. Kapitel 1.5). Eine *rim101Δ sfl1Δ*-Doppelmutante zeigt einen adhäsiven Phänotyp. Eine Erklärung für die Suppression des Adhäsionseffekts ergibt sich daraus, dass zwar der Transkriptionsrepressor Nrg1 in der *rim101Δ sfl1Δ*-Doppelmutante an den *FLO11*-Promotor binden kann, da er von der Rim101-Kontrolle entkoppelt ist, der Verlust des Sfl1-Repressors das Aktivierungsgleichgewicht des *FLO11*-Promotors jedoch positiv beeinflusst.

Snf1, die zentrale Serin-/Threonin-Proteinkinase des Snf1-/Glucose-Repressions-Signalwegs, wird durch Glucosemangel aktiviert (Wilson, 1996) und reguliert das filamentöse Wachstum durch Inhibition der Transkriptionsrepressoren Nrg1 und Nrg2 positiv (Kuchin *et al.*, 2002) (Kapitel 1.5). Vor diesem Hintergrund führte eine Deletion von *SNF1* in einer *rim101*-Deletionsmutante zu einem erwarteten starken, aber überraschenderweise nicht völligen Adhäsionsverlust wie bei einer *rim101*-Deletionsmutante. Snf1 reguliert also nicht nur die *FLO11*-Repressoren Nrg1 und Nrg2, sondern wirkt auch auf weitere bisher unbekannte Aktivatoren von *FLO11* epistatisch.

Sowohl durch eine *srb8Δ*- als auch eine *srb10Δ*-Mutation kann der nicht adhäsive Phänotyp einer *rim101*-Deletionsmutation supprimiert werden. Srb8 und Srb10 bilden zusammen mit Srb9 und Srb11 einen diskreten Komplex, der an der Repression zahlreicher Hefegene beteiligt ist (Carlson, 1997; Kim *et al.*, 2004). Srb10 und Srb11 kodieren für Homologe der Cyclin-abhängigen Kinase (CDK) und Cyclin C und arbeiten als ein CDK/Cyclin-Dimer (Kuchin *et al.*, 1995; Liao *et al.*, 1995), das *in vitro* die C-terminale Domäne (CTD) der größten Untereinheit der RNA-Polymerase II phosphorylieren kann (Hengartner *et al.*, 1998; Liao *et al.*, 1995). Eine Deletion der Gene für die Srb8- und Srb10-Untereinheiten aktiviert das invasive Wachstum in haploiden Hefezellen konstitutiv (Palecek *et al.*, 2000). Außerdem ist bekannt, dass der Srb8-11-Komplex die Expression von *NRG1* und *SFL1* in Gegenwart von Glucose positiv beeinflusst und so eine Repression des *STA1*-Promotors erfolgt, der zu dem von *FLO11* fast identisch ist (Gagiano *et al.*, 1999b; Kim *et al.*, 2004; Lo & Dranginis, 1996).



## 2.4 Regulation der *FLO11*-abhängigen Adhäsion durch pH

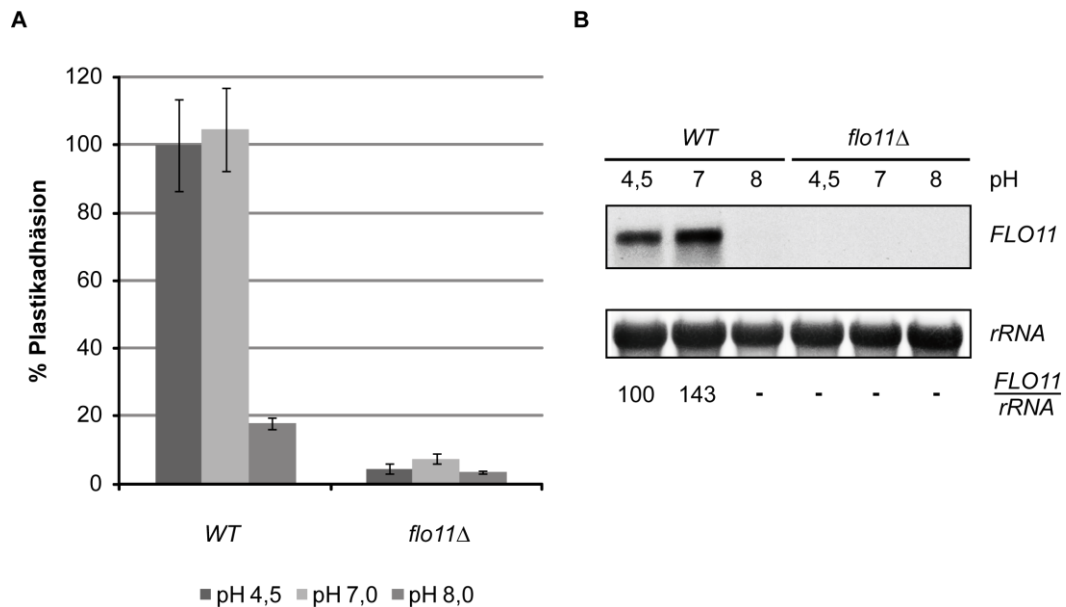
Die Regulation der Flo11-abhängigen Adhäsion durch pH wurde im *S. cerevisiae*  $\Sigma$ 1278b-Stammhintergrund bisher nicht untersucht und ist auch für die Bäckerhefe *S. cerevisiae* weitestgehend unbekannt. Da *FLO1*, *FLO5*, *FLO9* und *FLO10* in der Nähe von Telomerregionen liegen (vgl. Kapitel 1.4.1) und dadurch epigenetisch stillgelegt sind (Halme *et al.*, 2004), wurde in den folgenden Experimenten der Fokus auf die durch das Adhäsın Flo11 vermittelte Adhäsion und dessen pH-abhängige Regulation gerichtet. Neben *FLO11* wurden auch die unter Kapitel 2.1 und 2.2 bereits unter aziden Bedingungen analysierten Transkriptionsrepressoren des Rim101-Signalwegs Rim101, Nrg1, Nrg2 und Smp1 (Barrales *et al.*, 2008; Lamb & Mitchell, 2003; Lamb *et al.*, 2001) im Hinblick auf ihre pH-abhängige Regulation untersucht. So ist für den SK1-Stammhintergrund durch *lacZ*-Reportergergen-Versuche gezeigt worden, dass *RIM101*- und *NRG1*-abhängig die Expression des Gens für die Ena1 Na<sup>+</sup>-ATPase kontrolliert wird, die für das Wachstum in alkalischem Milieu und für die Ausbildung einer Na<sup>+</sup>- sowie Li<sup>+</sup>-Toleranz entscheidend ist. Während Rim101 die *NRG1*-Expression reprimiert, wirkt Nrg1 negativ regulierend auf *ENAI* (Lamb & Mitchell, 2003). Ena1 hydrolysiert ATP, um Na<sup>+</sup> aus der Zelle zu pumpen und so eine vakuoläre Azidifikation zu erreichen, die unter alkalischen Bedingungen nicht durch Endozytose generiert werden kann (Munn & Riezman, 1994; Nelson & Nelson, 1990). Der so generierte Gradient erlaubt erst dann den Import weiterer Kationen in die Zelle. Für eine *smp1*-Deletionsmutante hingegen konnte kein Einfluss auf die *ENAI*-Expression nachgewiesen werden. Eine *smp1Δ*-Mutation vermittelt allerdings eine leichte, Rim101- und Ena1-unabhängige Na<sup>+</sup>-Toleranz (Lamb & Mitchell, 2003). Stämme des SK1-Stammhintergrunds zeigen in alkalischem Milieu schwaches Wachstum an Agar. Unter diesen Bedingungen konnte durch Epistasisanalysen nachgewiesen werden, dass eine *nrg1Δ*-Mutation den Wachstumsdefekt einer *rim101*-Deletionsmutation unter pH 9 supprimieren kann (Lamb & Mitchell, 2003; Lamb *et al.*, 2001). Im  $\Sigma$ 1278b-Stammhintergrund konnten entsprechende Epistasisanalysen nicht durchgeführt werden, da Hefestämme dieses Stammhintergrundes unter alkalischen Bedingungen sofort in die stationäre Phase übergehen und somit kein Wachstum auf Agar nachweisbar ist (Daten nicht gezeigt).

### 2.4.1 Effekt von pH auf die Adhäsion

Um den Effekt von pH auf die Flo11-vermittelte Adhäsion im *S. cerevisiae*  $\Sigma$ 1278b-Stammhintergrund zu bestimmen, wurde die Adhäsion an Plastik, wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben, quantifiziert und die *FLO11*-Transkriptmenge ermittelt (Abbildung 31). Die Stämme wurden dazu in YNB+Ura bis zu einer  $OD_{600} = 0,7$  angezogen und anschließend für weitere 3 h in YNB+Ura unter pH 4,5, pH 7 bzw. pH 8 gepuffert in Polystyrol-Mikrotiterplatten weiterinkubiert. Diese Versuchsbedingungen wurden, sofern nicht anders angegeben, für alle weiteren pH-Versuche übernommen. Als Puffersubstanz wurde HEPES mit einer optimalen Pufferkapazität von pH 6,8-8,2 ausgewählt und mit einer Pufferkonzentration von 25 mM eingesetzt, um eine zu hohe Salz- bzw. Ionenkonzentration im Medium zu vermeiden und so unerwünschte osmotische Effekte auszuschließen. Durch die Wahl dieses Puffersystems wird eine optimale Einstellung für die Versuchsbedingungen pH 7 und pH 8 gewährleistet, was unter dem Gesichtspunkt der aktiven Azidifizierung des Umgebungsmilieus durch Hefepilze in den Bereich von pH 2-4, durch die Ausscheidung organischer Säuren und Protonen, von besonderer Bedeutung ist. Diese Eigenschaft wird von pathogenen Pilzen beim Befall eines neuen Wirtes genutzt und beeinflusst auch die Expression dafür relevanter Gene (Prusky & Yakoby, 2003).

In diesem Versuchsansatz wurde ebenfalls berücksichtigt, dass Hefezellen durch die Alkalisierung des Mediums ihr Wachstum reduzieren und in den Zustand der Cytostasis eintreten können (Hayashi *et al.*, 1998; Orij *et al.*, 2009). Die Zellen arretieren dann zeitnah in der G1-Phase des logarithmischen Wachstums. Sie sind hitzeschockresistent, was einen Hinweis auf den Eintritt in die stationäre Phase gibt. Diese Cytostasis ist jedoch reversibel und kann durch Rückpufferung in den aziden pH-Bereich rückgängig gemacht werden (Hayashi *et al.*, 1998). So wurde nach der dreistündigen Ruheinkubation der Hefezellen bei den Adhäsionsversuchen an Plastik durch Parallelinkubation in äquivalenten Glasschalen die  $OD_{600}$  am Versuchsende bestimmt. Diese Untersuchungen ergaben, dass die bei pH 4,5 und pH 7 gepufferten Kulturen im Vergleich zu den bei pH 8 inkubierten Kulturen nach 3 h eine maximal um 15 % erhöhte  $OD_{600}$  aufwiesen und somit die quantifizierte Plastikadhäsion nur minimal durch eine erhöhte Zellzahl beeinflusst wird (Daten nicht gezeigt). Während einer Schüttelinkubation für die Transkript-Analysen und Proteinbestimmungen nahm die  $OD_{600}$  während der dreistündigen Inkubationsphasen bei pH 4,5 um etwa das 1,7-fache,

bei pH 7 um das 1,5-fach im Vergleich zu pH 8 zu, wo die OD<sub>600</sub> sich nicht mehr veränderte.



**Abbildung 31 A und B: Effekt von pH auf die *FLO11*-abhängige Adhäsion**

**A)** Adhäsionstest an Polystyrol: Die Stämme wurden in YNB+Ura bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,7 angezogen und anschließend in YNB+Ura-Medium unter pH 4,5, pH 7 bzw. pH 8 gepuffert (25 mM HEPES) für weitere 3 h in Polystyrol-Mikrotiterplatten weiterinkubiert. Die Adhäsionsfähigkeit der Wildtyp-Zellen bei pH 4,5 wurde gleich 100 % gesetzt. Die Testreihe zeigt den Durchschnitt von drei Messwerten. **B)** Transkript-Analyse: Die Stämme wurden in YNB+Ura bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,7 inkubiert und anschließend die Gesamt-RNA der für 3 h in YNB+Ura-Medium unter pH 4,5, pH 7 bzw. pH 8 gepuffert (25 mM HEPES) weiterinkubierten *S. cerevisiae*-Stämme isoliert. Die Transkriptmenge von *FLO11* wurde durch eine Northern-Analyse, die *rRNA*-Menge durch Methylenblaufärbung bestimmt und für die Quantifizierung das Verhältnis zur *rRNA* ermittelt. Als Bezugsgröße diente der WT-Stamm pH 4,5. Angaben in Prozent. Verwendete Stämme: WT (YHUM0909), *flo11Δ* (YHUM0924).

Bei der Analyse der Adhäsion an Plastik stellte sich für den Wildtypstamm heraus, dass die Adhäsion bei pH 4,5 und pH 7 etwa vergleichbar ist, jedoch unter pH 8 auf etwa 20 % abnimmt (Abbildung 31 A). Das *FLO11*-Transkript korrelierte mit den Ergebnissen der quantitativen Adhäsionsanalyse, auch wenn sich die Erhöhung der Transkriptmenge um das 1,4-fache von pH 4,5 auf pH 7 nicht in einer erhöhten Adhäsion des Wildtypstamms reflektiert (Abbildung 31 B). Bereits bei pH 4,5 scheint unter diesen Bedingungen der transkriptionelle Schwellenwert im Wildtypstamm erreicht zu werden, der zu einer maximalen Adhäsion führt. Während unter pH 8 kein *FLO11*-Transkript mehr nachgewiesen werden konnte, scheint auf der Zelloberfläche dennoch genug Flo11-Protein remanent exponiert zu sein, um eine minimale Adhäsion von etwa 20 % im Vergleich zu pH 4,5 und pH 7 zu vermitteln. Als Kontrolle diente der *flo11Δ*-Stamm.

## 2.5 Globale pH-Antwort in adhäsiven Hefestämmen in saurem, neutralem und alkalischem Milieu

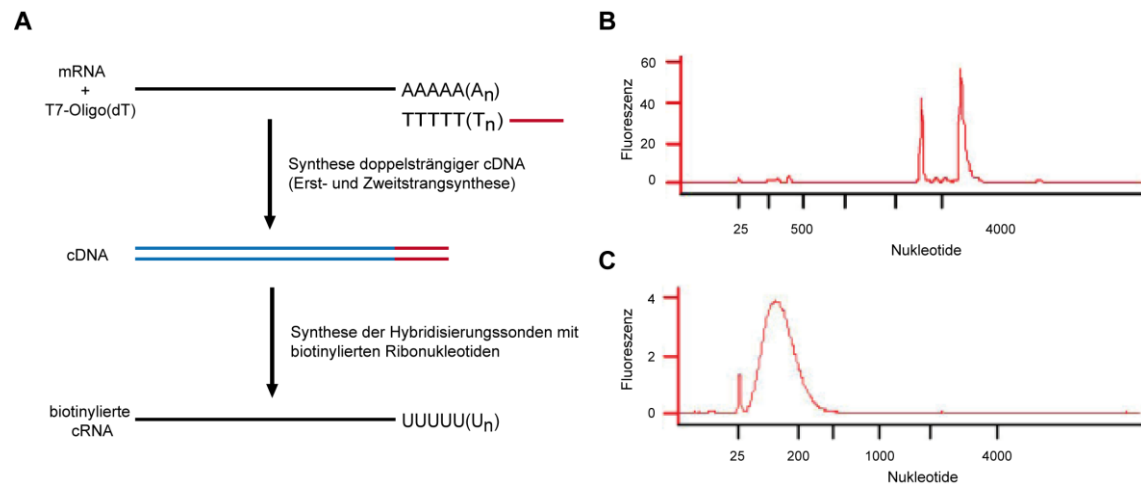
Für die Analyse der globalen Veränderungen der Genexpression in *S. cerevisiae*  $\Sigma$ 1278b als Antwort auf Änderungen der extrazellulären pH-Bedingungen wurde ein genomweites Transkriptprofiling mit „Yeast Genome 2.0 Arrays“ (AFFYMETRIX Inc.) durchgeführt.

Bisher verfügbare Microarray-Profile beantworten die in dieser Arbeit gestellte Frage nach der pH-abhängigen Transkriptregulation nur unzureichend, da sie andere Stammhintergründe abbilden, nicht in den relevanten pH-Bereichen durchgeführt wurden oder ein nicht synthetisches Medium verwendeten:

1. (Causton *et al.*, 2001):  
BY4741 (S288c)-Stammhintergrund; YPD pH 4 & pH 7,9; 0,1 M Tris; WT
2. (Lamb *et al.*, 2001): (Filter-Macroarray)  
SK1-Stammhintergrund; YPD, pH 4 & pH 8; 0,1 M HEPES; WT
3. (Lamb & Mitchell, 2003):  
SK1- und YC11-Stammhintergrund; YPD, ungepuffert; WT & *rim101* $\Delta$
4. (Mira *et al.*, 2009):  
BY4741 (S288c)- Stammhintergrund; MM4, WT & *rim101* $\Delta$
5. (Serrano *et al.*, 2002):  
Stamm: DBY746 (D. Botstein, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Mass.); YPD pH 6,4 & YPD pH 7,6 mit 20 mM TAPS, WT

Für das hier durchgeführte Transkriptprofiling wurden ein Wildtypstamm (YHUM0909) und eine *rim101*-Deletionsmutante (YHUM1461) gewählt. Die Stämme wurden in YNB+Ura bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,7 angezogen und anschließend für weitere 3 h in 25 mM HEPES gepuffertem YNB+Ura-Medium weiterinkubiert; der Wildtyp bei pH 4,5, pH 7 bzw. pH 8, der *rim101*-Deletionsstamm bei pH 7 bzw. pH 8, da hier eine Rim101-abhängige Adaptierung an alkalisches pH-Milieu vermutet wird. Insgesamt wurden zwei Ansätze pro Stamm und Bedingung, d.h. zwei unabhängige biologische Replikate an verschiedenen Tagen, für die weitere Analyse herangezogen und die Gesamt-RNA extrahiert. Die Herstellung der cRNA-Hybridisierungssonden ist schematisch in Abbildung 32 A dargestellt. Die Qualität und Quantität der isolierten RNA wurde mittels Kapillargelelektrophorese auf einem „Bioanalyzer 2100“

(AGILENT TECHNOLOGIES DEUTSCHLAND GmbH) bestimmt (Abbildung 32 B). Ausgehend von der isolierten Gesamt-RNA der zu vergleichenden Proben wurde zunächst eine reverse Transkription mit T7-Oligo(dT)-Oligonukleotiden für die Erststrang-cDNA-Synthese durchgeführt, an die sich die Zweitstrang-cDNA-Synthese mit gleichzeitiger Restriktion der noch vorhandenen rRNA anschloss, um doppelsträngige cDNA zu generieren. Die durchschnittliche Transkriptlänge lag bei ca. 1400-1600 bp (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 32: Schematische Darstellung der Synthese der cRNA-Hybridisierungssonden**

**A)** Ausgehend von der isolierten Gesamt-RNA wurde zunächst eine reverse Transkription mit T7-Oligo(dT)-Oligonukleotiden durchgeführt, um doppelsträngige cDNA zu erzeugen (Erst- und Zweitstrangsynthese). Darauf folgte eine weitere *in vitro* Transkription unter gleichzeitiger Markierung der Hybridisierungssonden mit biotinylierten Ribonukleotiden. Die Qualität und Quantität der isolierten Gesamt-RNA, sowie der cRNA-Hybridisierungssonden wurden mittels Kapillargelelektrophorese auf einem „Agilent 2100-Bioanalyzer“<sup>®</sup> (AGILENT TECHNOLOGIES DEUTSCHLAND GmbH) bestimmt (**B** und **C**). **B)** Die Qualität der Gesamt-RNA wurde anhand der Integrität der ribosomalen Banden überprüft. **C)** Vor der Hybridisierung des DNA-Microarrays wurden die biotinylierten cRNA-Transkripte auf eine durchschnittliche Größe von ca. 30-200 bp fragmentiert.

Daraufhin erfolgte eine *in vitro* Transkription unter gleichzeitiger Markierung der Hybridisierungssonden mit biotinylierten Ribonukleotiden. Die markierten Sonden wurden vor der Hybridisierung mit dem *S. cerevisiae*-Microarray-Chip auf eine Größe von 30-200 bp fragmentiert (Abbildung 32 C). Nach der Hybridisierung der entsprechenden Sonden wurden die Microarrays mit Hilfe eines Scanners eingelesen und anschließend mit der Affymetrix-Software MAS 5.0 normalisiert, sowie die entsprechenden Expressionswerte kalkuliert.

Die Analyse der Expressionsänderungen erfolgte mittels Microsoft Excel. Es wurde der p-Wert bestimmt, wobei das Ergebnis die Wahrscheinlichkeit eines gepaarten t-Tests mit zweiseitiger Verteilung berücksichtigt. Nur Gene, die in den Ausgangsvergleichen unter den getesteten Bedingungen einen p-Wert  $\leq 0,05$  und eine um mindestens Faktor 2

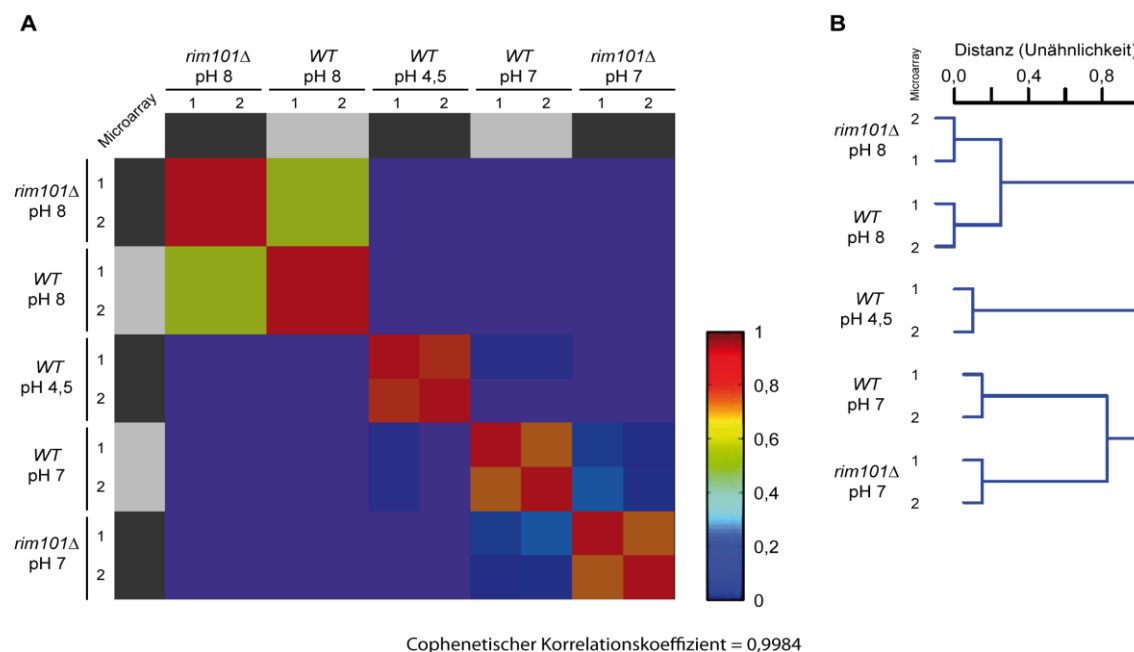
veränderte Expression aufwiesen, wurden in der weiteren Analyse berücksichtigt. Alle Daten der Auswertungen sind im Anhang als Daten-CD angefügt.

### 2.5.1 Globales NMF-Konsensus-Clustering

Die nicht-skalierten RNA Signal-Intensitäts-Dateien (CEL) der ausgelesenen Yeast Genome 2.0 Arrays wurden mit dem Modul „ExpressionFileCreator (GenePattern)“ (Reich *et al.*, 2006) in MAS 5.0 normalisierte GCT-Dateien überführt und die *S. cerevisiae* Expressionsdaten mittels Excel für die weitere Analyse extrahiert. Es folgte ein Clustering durch Nicht-negative Matrix-Faktorisierung (NMF), einem unüberwachten lernenden Algorithmus (Lee & Seung, 1999), durch den molekulare Muster in den erhobenen Expressionsdaten identifiziert werden können (Brunet *et al.*, 2004). In Abbildung 33 A ist die geordnete Matrix des Klasse  $k = 5$  NMF-Konsensus-Clusterings dargestellt. Die Proben sind hierarchisch durch die Distanz der Konsensus-Matrix-Einträge geclustert. Die Matrixeinträge im Bereich von 0 bis 1 reflektieren die Wahrscheinlichkeit, dass jedes Probenpaar gemeinsam clustert. Bei einem stabilen Clustering sind die Einträge nahe 0 (clustern niemals zusammen) oder 1 (clustern oft zusammen). Die Verteilung zwischen 0 und 1 gibt so die Reproduzierbarkeit der Abgrenzungen der jeweiligen Klasse unter Berücksichtigung der zufälligen Initialbedingungen wieder.

Durch NMF konnten alle fünf Microarray-Expressionsdatensätze, WT pH 4,5, WT pH 7, WT pH 8, *rim101Δ* pH 7 und *rim101Δ* pH 8, deutlich geclustert werden, wobei das Clustering derart fein ist, dass sogar eine Differenzierung der zwei biologischen Replikate durch rot-rotorange-Blockbildung augenscheinlich wird. Die geclusterten Proben, die oft in demselben Cluster vorkommen, heben sich durch eine rote bzw. rot-braunorange diagonale Blockbildung deutlich von den selten (blau) oder niemals (dunkelblau) gemeinsam geclusterten Proben ab. In der Konsequenz bedeutet dieses Ergebnis, dass die fünf gewählten Versuchsansätze eine derart unterschiedliche Genexpression aufweisen, dass sie selten miteinander clustern. Würden zwei Versuchsansätze sich kaum unterscheiden, würde dies in der Bildung eines Großclusters resultieren. Ein solches Großcluster bildet sich beispielsweise für die Versuchsansätze WT pH 8 und *rim101Δ* pH 8. Das Großcluster besteht hier jedoch aus jeweils zwei grünen und zwei roten Blöcken. Dies deutet darauf hin, dass ein selteneres Clustering

der Proben der beiden Versuchsansätze stattfindet. Grund hierfür ist sicherlich eine stärker voneinander abweichende Genexpression, als dies bei den rein rot-rotorange Clustern der Fall ist, was darauf hindeutet, dass unter pH 8 eine *rim101*-Deletion zu einer Veränderung der globalen Genexpression führt. Diese *RIM101*-abhängige Veränderung ist jedoch wesentlich geringer, als dies zwischen WT pH 7 und *rim101* $\Delta$  pH 7 der Fall ist, die sehr selten miteinander clustern, wodurch sich ein blaues Clustering ergibt.



**Abbildung 33: Globale Microarrayanalyse durch Nicht-negative Matrix-Faktorisierung**

**A)** Geordnete Konsensus-Matrix für eine Klasse  $k = 5$  NMF („GenePattern“ (Reich *et al.*, 2006)). Es wurde das Yeast Genome 2.0 Array-Expressionsdaten-Set WT pH 4,5, WT pH 7, WT pH 8, *rim101* $\Delta$  pH 7 und *rim101* $\Delta$  pH 8 mit zwei unabhängigen biologischen Replikaten verwendet. Die relevanten *S. cerevisiae*-Datensätze mit 5715 Genen wurden aus dem Datenset extrahiert und analysiert. Die Proben sind hierarchisch durch die Distanz der Konsensus-Matrix-Einträge geclustert. Dunkelblau gibt einen numerischen Wert von 0 wieder, was bedeutet, dass die ausgewählten Proben niemals im selben Cluster vorkommen. Dunkelrot korrespondiert mit 1 und bedeutet, dass die ausgewählten Proben immer im gleichen Cluster vorkommen. Die 0-1 Skala gibt eine robuste Klassifizierung wieder. Der Cophenetische Korrelationskoeffizient beträgt 0,9984. In einer perfekten Konsensus-Matrix (alle Einträge = 0 oder 1) beträgt der Korrelationskoeffizient 1. **B)** Dendrogramm des NMF-Konsensus-Clusterings. Die Länge der Astgabeln stellt die Distanz (Unähnlichkeit; 0 = minimal, 1 = maximal) der Versuchsansätze zueinander dar.

In Abbildung 33 B sind die Ergebnisse des NMF-Konsensus-Clusterings als Dendrogramm dargestellt. Die Distanz (Unähnlichkeit) des Clusterings ist pH-abhängig am größten, wobei die Distanz zwischen den Proben unter pH 4,5 und pH 7 geringer als zu pH 8 ist. Die Clusterunterschiede zwischen WT und *rim101*-Deletionsmutante bei pH 7 und pH 8 sind den jeweiligen pH-Bedingungen in Nebenästen untergeordnet. Die Distanz zwischen WT und *rim101* $\Delta$ -Mutante unter pH 8 sind jedoch geringer, als dies bei pH 7 der Fall ist. Diese Ergebnisse erlauben die Vermutung, dass pH als

biologischer Faktor auf die globale Genexpression einen stärkeren Effekt als eine *rim101*-Deletion hat. Der Effekt einer *rim101*-Deletion ist dabei unter pH 8 weniger deutlich als unter pH 7, was in einer generellen Umschichtung und Veränderung der Genexpression unter alkalischen pH-Bedingungen begründet sein könnte.

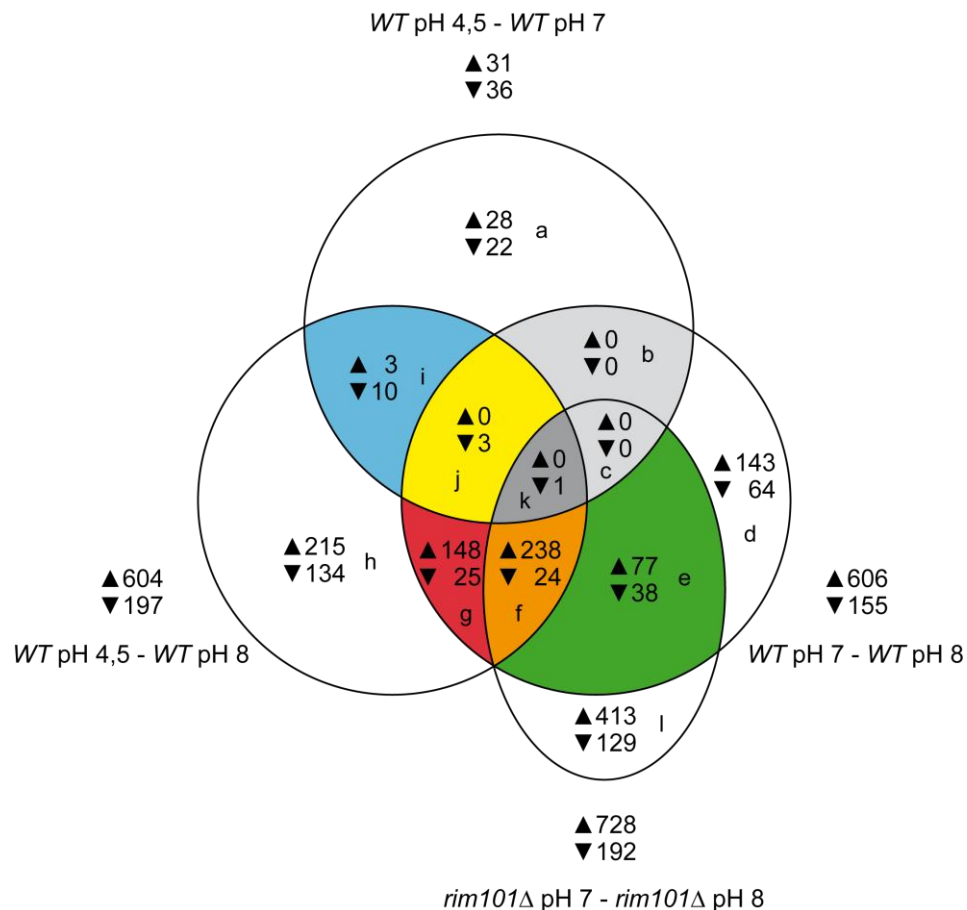
### 2.5.2 Globale Transkriptomanalyse

Für die folgende vergleichende Transkriptomanalyse der fünf Microarray-Expressionsdatensätze WT pH 4,5, WT pH 7, WT pH 8, *rim101Δ* pH 7 und *rim101Δ* pH 8 wurden jeweils diejenigen Gene herangezogen, die unter den getesteten Bedingungen einen p-Wert  $\leq 0,05$  und eine um mindestens Faktor 2 veränderte Expression aufwiesen. Zunächst wurden vier Expressionsdaten-Vergleiche, WT pH 4,5 - WT pH 7, WT pH 4,5 - WT pH 8, WT pH 7 - WT pH 8 und *rim101Δ* pH 7 - *rim101Δ* pH 8, durchgeführt (Basis des jeweiligen Vergleichs ist die zuerst genannte Bedingung), deren Ergebnisse Grundlage für die Bildung eines Venn-Diagramms (Abbildung 34) waren. Überschneidungsbereiche dieses Diagramms stellen eine ähnliche Gen-Expression innerhalb der vier Ausgangsvergleiche dar. Die durch diese vergleichende Analyse gewonnenen Teil- und Schnittmengen wurden anschließend nach der Überrepräsentation von Genen in funktionell annotierte Kategorien klassifiziert. Für die statistische Analyse wurde ein Test auf hypergeometrische Verteilung mittels FunSpec (Functional Specification; <http://funspec.med.utoronto.ca/>) mit einem p-Wert  $\leq 0,01$  durchgeführt, dem die Datenbank FUNCAT (MIPS Functional Categories, <http://mips.gsf.de/proj/funcatDB/>, Version 24. März 2009) (Ruepp *et al.*, 2004) zu Grunde liegt. Wenn möglich wurden funktionell angereicherte Sub-Kategorien zum Zwecke der Übersichtlichkeit zusammengefasst und daran anschließend die relative Verteilung der in der GO-Annotation angereicherten Gene in funktionellen Kategorien dargestellt (Abbildung 35). Die angereicherten funktionellen Gruppen differentiell exprimierter Gene für die vier Ausgangsvergleiche und ihre Schnittmengen werden im Folgenden näher beschrieben und sofern möglich im Text detaillierter bezeichnet.

Der Vergleich WT pH 4,5 - WT pH 7 ergab eine differentielle Expression von 67 Genen (Abbildung 34). Eine erhöhte Expression konnte für Gene aus den funktionellen Kategorien Homeostasis (Phosphat; Kationen), Proteinbindung (NAD/NADP), Energiebereitstellung (Citratzyklus), AS-Metabolismus (Biosynthese von Glutamat),



Transport (Phosphat) und Transporter (Natrium getriebene Symporter) ermittelt werden. Die Expression von Genen aus den funktionellen Kategorien Biogenese zellulärer Komponenten (Zytoskelett, Strukturproteine), Transport von AS und Transkriptionsrepression war hingegen erniedrigt (Abbildung 35).



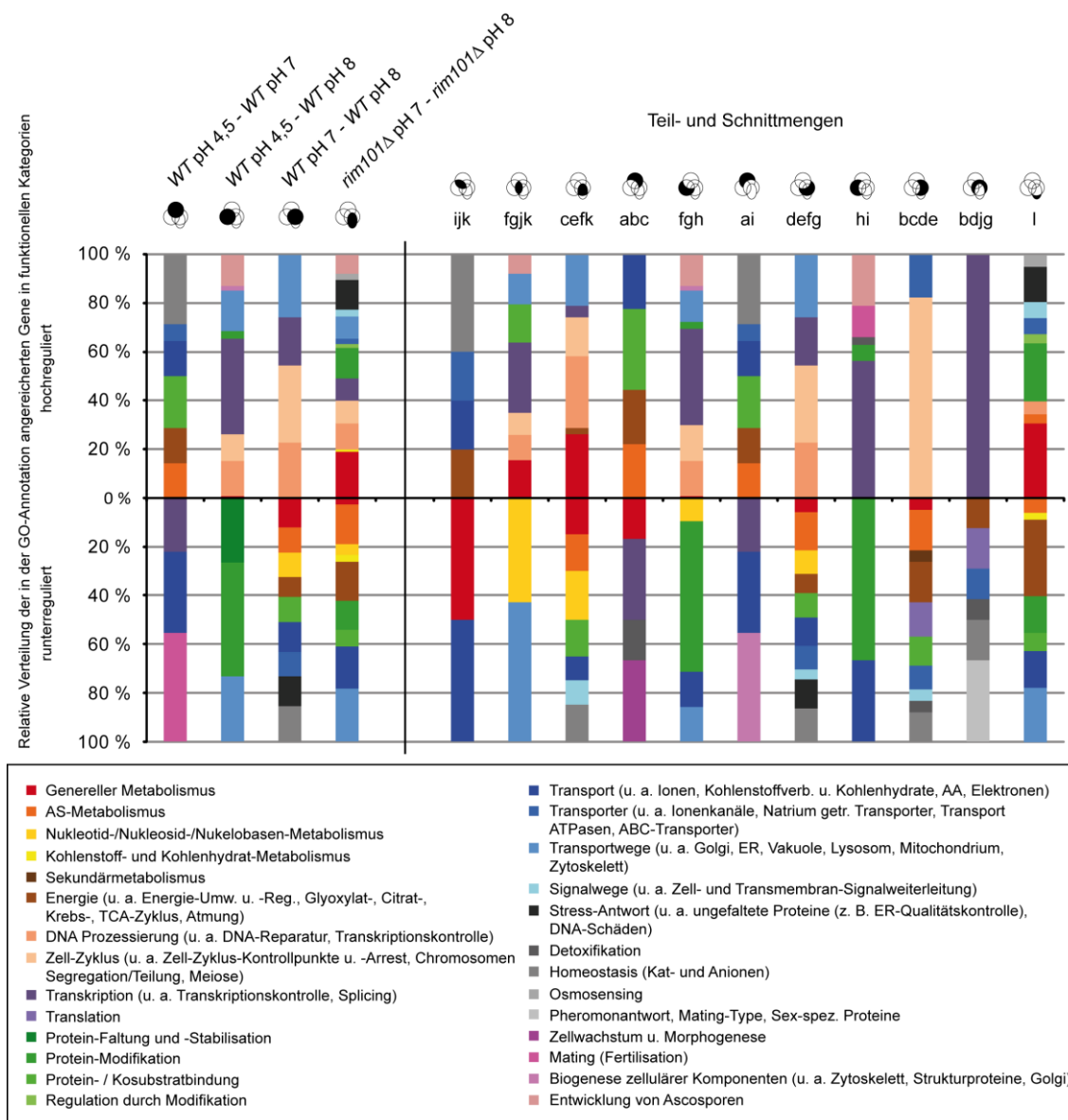
**Abbildung 34: Vergleichende Transkriptomanalyse WT pH 4,5, pH 7, pH 8 & *rim101Δ* pH 7 und pH 8**

Dargestellt sind die vier Ausgangsvergleiche WT pH 4,5 - WT pH 7; WT pH 4,5 - WT pH 8; WT pH 7 - WT pH 8 und *rim101Δ* pH 7 - *rim101Δ* pH 8 mit ihren jeweiligen Teil- und Schnittmengen. Es wurden für die Analyse nur diejenigen Gene berücksichtigt, die unter den getesteten Bedingungen einen p-Wert  $\leq 0,05$  und eine um mindestens Faktor 2 veränderte Expression aufwiesen. Außerhalb des Venn-Diagramms ist die Zahl der differentiell exprimierten Gene der vier Ausgangsvergleiche, innerhalb des Diagramms ist die Zahl der differentiell exprimierten Gene der jeweiligen Schnitt- und Teilmenge dargestellt. Für die weiteren Analysen wurden die einzelnen Mengen alphabetisch gekennzeichnet und zum Zwecke der Übersichtlichkeit teilweise farbig markiert. (Basis des jeweiligen Vergleichs ist die zuerst genannte Bedingung.)

Während beim Vergleich der WT-Expressionsdatensätze des aziden und neutralen pH-Bereichs also nur wenige Gene differentiell exprimiert waren, ergab sich für den Vergleich der unter pH 4,5- und pH 7-Bedingungen gewonnenen Expressionsdaten mit den unter pH 8 erhobenen eine globale Veränderung der Genexpression. So wurde für die Transkriptom-Vergleiche WT pH 4,5 - WT pH 8 und WT pH 7 - WT pH 8 mit 801 respektive 761 eine ähnlich hohe Zahl differentiell exprimierter Gene bestimmt. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass es auch eine hohe Anzahl gleichartig

differentiell exprimierter Gene geben könnte, was durch die Bildung einer Schnittmenge beider Vergleiche für 438 Gene bestätigt wird (Abbildung 34, fgjk). Diese Schnittmenge umfasst Gene aus den funktionellen Kategorien Transkription (Kontrolle; Repression), Proteinbindung, Transport (intra-Golgi), Genereller Metabolismus (Phosphat), DNA-Prozessierung (Reparatur), Zellzyklus (Meiose) und Entwicklung von Ascosporen, deren Expression beim Vergleich der unter sauren und neutralen mit den unter alkalischen Versuchsbedingungen gewonnenen *WT*-Expressionsdatensätzen gleichermaßen erhöht war. Die Expression von Genen aus den funktionellen Kategorien des Nukleotid- /Nukleosid- und Nukleobasen-Anabolismus (Purine) war neben Genen des ER- zu Golgi-Transports erniedrigt (Abbildung 35, fgjk). Insbesondere die Anreicherung der funktionellen Kategorien Meiose und Entwicklung von Ascosporen ist überraschend, da haploide Hefezellen nicht in die Meiose eintreten können. Eine Anreicherung dieser Kategorien deutet möglicherweise auf besondere Stressbedingungen unter alkalischen pH-Bedingungen hin.

In beiden Ausgangsvergleichen *WT* pH 4,5 - *WT* pH 8 und *WT* pH 7 - *WT* pH 8 nahmen die funktionellen Kategorien Transkription (Spleißen), Transportwege (Vakuole, Lysosom; intra-Golgi), DNA-Prozessierung (Reparatur) und Zellzyklus (Meiose) gleichermaßen einen prominenten Teil derjenigen Gene ein, die eine erhöhte Expression zeigten (Abbildung 35). Weitere funktionelle Kategorien wurden für den Vergleich *WT* pH 4,5 - *WT* pH 8 annotiert: Transkription (Kontrolle), Entwicklung von Ascosporen, Biogenese zellulärer Komponenten (Golgi), Proteinmodifikation (autoproteolytische Prozessierung) und Genereller Metabolismus. Die funktionell annotierten Kategorien für Gene mit erniedrigter Genexpression zeigten hingegen ein wesentlich differenzierteres Bild. Hier wurden keine gemeinsamen funktionellen Kategorien angereichert. Während für den Vergleich *WT* pH 4,5 - *WT* pH 8 die funktionellen Kategorien Protein-Modifikation (O- und N-gerichtete Glykosilierung), Proteinfaltung/-stabilisation und Transport (ER- zu Golgi-Transport) bestimmt werden konnten, wurden für den Vergleich *WT* pH 7 - *WT* pH 8 die Kategorien Homeostasis (Protonen), Transport (Kationen), Genereller Metabolismus (Sulfat-Assimilation; Aminodipinsäure-Weg), Transporter (ATPasen), Nukleotid- /Nukleosid- und Nukleobasen-Anabolismus (Purine), AS-Metabolismus (Methionin; Glutamat), Kosubstratbindung (NAD/NADP), Stress-Antwort (ungefaltete Proteine) und Energie (Citratzyklus) bestimmt.



**Abbildung 35: Funktionelle Kategorisierung von *S. cerevisiae*-Genen**

Die vier Vergleiche *WT* pH 4,5 - *WT* pH 7, *WT* pH 4,5 - *WT* pH 8, *WT* pH 7 - *WT* pH 8 und *rim101Δ* pH 7 - *rim101Δ* pH 8 mit ihren jeweiligen Teil- und Schnittmengen (a-l) (Abbildung 34) wurden hinsichtlich der Überrepräsentation von Genen in funktionell annotierten Kategorien klassifiziert. Für die statistische Analyse wurde ein Test auf hypergeometrische Verteilung mittels FunSpec (Functional Specification; <http://funspec.med.utoronto.ca/>) und einem  $p$ -Wert  $\leq 0,01$  durchgeführt. Funktionell angereicherte Sub-Kategorien wurden zum Zwecke der Übersichtlichkeit zusammengefasst und daran anschließend die relative Verteilung der in der GO-Annotation angereicherten Gene in funktionellen Kategorien dargestellt.

Ein derartig unterschiedliches Anreicherungsmuster funktioneller Kategorien für Gene mit erniedrigter Genexpression für die Ausgangsvergleiche *WT* pH 4,5 - *WT* pH 8 und *WT* pH 7 - *WT* pH 8 dürfte zunächst verwundern, hierfür findet sich allerdings eine schlüssige Erklärung. Beim Vergleich der *WT*-Expressionsdatensätze pH 4,5 und pH 8 ergibt sich trotz der hohen Anzahl differentiell exprimierter Gene eine große Streuung von Genen aus den unterschiedlichsten funktionellen Kategorien, die für eine Anreicherung bestimmter funktioneller Kategorien insgesamt nicht signifikant ist. Beim

Vergleich der *WT*-Expressionsdatensätze pH 7 und pH 8 wurde zwar eine ähnlich hohe Anzahl differentiell exprimierter Gene wie für den Vergleich *WT* pH 4,5 - *WT* pH 8 bestimmt, die Gene konnten hier jedoch vielen ähnlichen funktionellen Kategorien zugeordnet werden.

Insgesamt ergibt sich beim Vergleich der unter sauren und neutralen mit den unter alkalischen Versuchsbedingungen gewonnenen *WT*-Expressionsdatensätze eine nicht zufällig veränderte globale Genexpression. Vielmehr scheint durch alkalische pH-Bedingungen eine gezielte Expression von Genen bestimmter funktioneller Bereiche induziert zu werden.

Diese Vermutung wurde auch beim Vergleich der Expressionsdatensätze *rim101Δ* pH 7 und *rim101Δ* pH 8 bestätigt, der die pH-abhängige Analyse der Genexpression in Abwesenheit von *RIM101* berücksichtigt. Es konnten im Vergleich *rim101Δ* pH 7 - *rim101Δ* pH 8 viele funktionelle Kategorien annotiert werden, die bereits im Vergleich *WT* pH 7 - *WT* pH 8 angereichert wurden, was durch die ähnliche Bänderung insbesondere funktioneller Hauptkategorien für Gene mit reduzierter Genexpression zutrifft (Abbildung 35). Dennoch waren nur 378 bzw. weniger als 50 % aller Gene gemeinsam pH 7- und pH 8-abhängig, aber *RIM101*-unabhängig differentiell exprimiert (Abbildung 34, cefk). Die gemeinsame Schnittmenge umfasste für Gene mit erhöhter differentieller Expression die funktionellen Kategorien Genereller Metabolismus (Phosphat), DNA-Prozessierung (Reparatur; DNA-Konformationsmodifikation), Transportwege (Zytoskelettabhängig), Zell-Zyklus (Arrest; Meiose), Transkription (Repression) und Energie (Konversion zu kinetischer Energie), wohingegen die differentielle Expression von Genen aus den Kategorien Nukleotid-, Nukleosid-, Nukleobasen Anabolismus (Purine), Genereller Metabolismus (Sulfat-Assimilation; Sulfat-Verbindung), AS-Metabolismus (Aminodipinsäure-Weg), Kosubstratbindung (NAD/NADP), Homeostasis (Protonen), Transport (Phosphat) und Signalwege verringert war.

In Abwesenheit von *RIM101* wurden beim Vergleich der unter pH 7 und pH 8 gewonnenen Expressiondatensätze gegenüber dem Wildtypstamm 17 % mehr Gene differentiell exprimiert (Abbildung 34) und die Anreicherung funktioneller Kategorien war insgesamt wesentlich differenzierter (Abbildung 35). Dies könnte auf eine in hohem Maße *RIM101*-abhängige Aufrechterhaltung des transkriptionellen








Gleichgewichts unter alkalischen Stress-Bedingungen hindeuten und spiegelt sich auch in der Anreicherung einer großen Zahl funktioneller Kategorien wider. Während die relative Genexpression in den Bereichen DNA-Reparatur/Transkription und Zellzyklus (Arrest; Meiose) zunimmt, wird die Expression von Genen aus energieaufwendigen Bereichen reduziert. So konnten für Gene mit erhöhter Genexpression die funktionellen Kategorien Genereller Metabolismus (Phosphat), Stress-Antwort (DNA-Beschädigung), Protein-Modifikation (Phosphorylierung, De- und Autophosphorylierung; autoproteolytische Prozessierung), DNA-Prozessierung (Reparatur; Meiotische Rekombination), Zell-Zyklus (Arrest; Meiose), Transportwege (Vakuole, Lysosom), Transkription (Repression; Spleißen), Entwicklung von Ascosporen, Signalwege, Osmosensing, Transporter (ABC), Regulation durch Modifikation, und Kohlenstoff- und Kohlenhydrat-Metabolismus (Chitin Anabolismus) angereichert werden, wohingegen für Gene mit reduzierter Genexpression die funktionellen Kategorien Transportwege (Mitochondrien; ER zu Golgi; ER nicht-vesikulär), Transport (Phosphat; Kohlenstoff- und Kohlenhydrat; Elektronen), AA-Metabolismus (Biosynthese von Cystein, Glutamat, Isoleucin und Serin; Degradation von Lysin; Aminodipinsäure-Weg), Energie (Elektronentransport und membranassoziierte Energieerhaltung; Energie-Bereitstellung; Atmung), Kosubstratbindung (NAD/NADP), Nukleotid-, Nukleosid-, Nukleobasen-Metabolismus (Purine), Genereller Metabolismus (Sulfat-Assimilation), Kohlenstoff- und Kohlenhydratmetabolismus (Tetrahydrofolat-abhängiger C-1-Transfer) und Sekundärmetabolismus (Fettsäuremodifikation; O- und N-gerichtete Glykosylierung) annotiert wurden.

### 2.5.3 Analyse auf Anreicherung bestimmter Transkriptionsfaktorbindestellen

Mittels Ceres (<http://wyrickserver.smb.wsu.edu/cgi-bin/Ceres/cgi/home.pl>, Version 24. März 2009) (Morris *et al.*, 2010) und einem vorgegebenen p-Wert  $\leq 0,001$  wurden die in den Ausgangsvergleichen (WT pH 4,5 - WT pH 7; WT pH 4,5 - WT pH 8; WT pH 7 - WT pH 8 und *rim101Δ* pH 7 - *rim101Δ* pH 8) sowie allen Teil- und Schnittmengen differentiell exprimierten Gene (Abbildung 34) hinsichtlich der Anreicherung bestimmter Transkriptionsfaktorbindestellen in ihren Promotoren untersucht. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Tabelle 4 dargestellt und berücksichtigt konservierte, experimentell validierte und bioinformatisch vorausgesagte Bindestellen von 104 Hefe-Transkriptionsfaktoren.

**Tabelle 4: Analyse auf Anreicherung bestimmter Transkriptionsfaktorbindestellen in der vergleichenden Transkriptomanalyse**

Es sind die mittels Ceres unter einem p-Wert  $\leq 0,001$  angereicherten Transkriptionsfaktorbindestellen der vergleichenden Transkriptomanalyse (Abbildung 34) dargestellt.

| analysierte Menge   | Genexpression | angereicherte Transkriptionsfaktorbindestellen |
|---|---------------|--|
| WT pH 4,5 - WT pH 8                        | erniedrigt    | Fkh1, Fkh2, Mbp1, Ndd1, Swi6                   |
| WT pH 7 - WT pH 8                          | erniedrigt    | Rpn4   |
| <i>rim101Δ</i> pH 7 - <i>rim101Δ</i> pH 8  | erniedrigt    | Cbf1, Hap2                                     |
| d + e + f + g                              | erniedrigt    | Rpn4   |
| h + i                                      | erniedrigt    | Fkh1, Fkh2, Swi6                               |
| f + g + h                                  | erniedrigt    | Fkh1, Mbp1                                     |
| l    | erniedrigt    | Hap2, Hap3                                     |

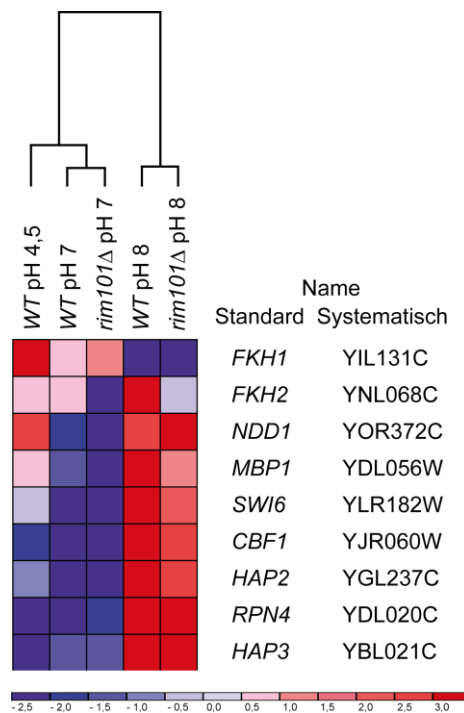
Die in dieser Analyse angereicherten Transkriptionsfaktorbindestellen umfassten ausschließlich diese von Genen mit erniedrigter Genexpression:

Für den Vergleich pH 4,5 - WT pH 8 wurden die Bindestellen der fünf Transkriptionsfaktoren Fkh1, Fkh2, Mbp1, Ndd1 und Swi6 bestimmt. Fkh1 und Fkh2 regulieren die Transkription von *CLB2* und weiteren Genen, die an der Mitose beteiligt sind, die ihrerseits wiederum Antagonisten des filamentösen Wachstums darstellen (Zhu *et al.*, 2000). Das DNA-Bindeprotein Mbp1 bildet zusammen mit Swi6 den MBF-Komplex (Mlu1 Cell Cycle Box [MCB] Binding Factor). Der MBF-Komplex reguliert als Transkriptionsfaktor die Genexpression während des G1/S-Phase Zellzyklus-Übergangs (Bähler, 2005; Breeden, 1996; Koch *et al.*, 1993; Koch & Nasmyth, 1994). Ndd1 (Nuclear Division Defective) ist ein essentieller Transkriptionsaktivator, dessen Expression während des Zellzyklus streng reguliert wird. Er ist Bestandteil eines Mechanismus, der gezielt die Expression später S-Phase Gene aktiviert (Loy *et al.*, 1999).

Bindestellen für den Transkriptionsfaktor Rpn4 wurden ausschließlich für den Vergleich WT pH 7 - WT pH 8 bestimmt. Dieser Transkriptionsfaktor stimuliert insbesondere die Expression zahlreicher Proteasom-Gene und wird durch verschiedene Stress-Antworten reguliert (Mannhaupt *et al.*, 1999; Xie & Varshavsky, 2001).

In der Analyse des Vergleichs *rim101Δ* pH 7 - *rim101Δ* pH 8 wurden Bindestellen der beiden Transkriptionsfaktoren Cbf1 und Hap2 angereichert. Cbf1 ist ein Centromer-Bindefaktor, der unter anderem an der *MET*-Genexpression beteiligt ist (Kent *et al.*, 2004; Niedenthal *et al.*, 1991). Hap2 bildet die Untereinheit eines heteromeren

Transkriptionsfaktorkomplexes, der sich aus den Untereinheiten Hap2, Hap3, Hap4 und Hap5 zusammensetzt. Dieser Komplex wird durch Häm aktiviert und durch Glucose reprimiert, wobei er als transkriptioneller Aktivator und globaler Regulator die respiratorische Genexpression beeinflusst (Forsburg & Guarente, 1989; Hahn *et al.*, 1988; McNabb *et al.*, 1995; Olesen *et al.*, 1987; Pinkham & Guarente, 1985; Pinkham *et al.*, 1987).



**Abbildung 36: Hierarchisches Clustering von Transkriptionsfaktorgenen mit angereicherten TFBs**

Dargestellt ist das hierarchische Clustering von Genen, die für Transkriptionsfaktoren kodieren, deren Bindestellen (Tabelle 4) in der vergleichenden Transkriptomanalyse (Abbildung 34) überrepräsentiert waren. Hierzu wurden die relevanten Datensätze der Microarray-Versuchsansätze WT pH 4,5, WT pH 7, WT pH 8, *rim101Δ* pH 7 und *rim101Δ* pH 8 extrahiert und für das hierarchische Clustering mittels „GenePattern“ verwendet (Eisen *et al.*, 1998; Golub *et al.*, 1999; Reich *et al.*, 2006). Der maximale absolute foldchange von *FKH1*, *FKH2*, *HAP3*, *NDD1*, *RPN4* und *SWI6* war geringer als 1,73-fach und lag bei *CBF2*, *MBP1* und *HAP2* zwischen 1,98-2,28-fach. Es zeigte sich, dass alle analysierten Gene mit Ausnahme von *FKH1*, *FKH2* und *NDD1* *RIM101*-unabhängig eine höhere relative Genexpression unter pH 8 im Vergleich zu pH 4,5 und pH 7 aufwiesen. Während die *FKH1*-Genexpression im Vergleich zu pH 4,5 und pH 7 unter pH 8 reduziert war, ergab sich für *FKH2* eine *RIM101*-abhängige Erhöhung der relativen Genexpression unter pH 8. Für *NDD1* wurde eine reduzierte relative Genexpression unter pH 7 im Vergleich zu pH 4,5 und pH 8 festgestellt. Die relative Expressionsstärke der Signale wird durch den im Bild dargestellten Farbcode verdeutlicht. Bei dieser Art der Darstellung (Eisen *et al.*, 1998) werden durch die rote Farbe Expressionswerte wiedergegeben, die über der durchschnittlichen Expression des Gens für alle Einzelerperimente liegen. Niedrige Expressionswerte sind lila markiert.

Insgesamt beeinflussen die den angereicherten Bindestellen assoziierten Transkriptionsfaktoren vor allem die Regulation von Komponenten aus den Bereichen Zellzyklus (durch die Transkriptionsfaktoren: Cbf1, Fkh1, Fkh2, Mbp1, Ndd1, Swi6), Proteinabbau (Proteasom assoziierte Komponenten) (durch den TF: Rpn4) und respiratorischer Genexpression (durch die TF: Hap2 und Hap3). Durch das hierarchische Clustering

konnte für die angereicherten Transkriptionsfaktorgene, mit Ausnahme von *FKH1*, *FKH2* und *NDD1* zudem eine erhöhte, hauptsächlich *RIM101*-unabhängige, relative Genexpression unter alkalischen pH-Bedingungen im Vergleich zu aziden und neutralen Umgebungsbedingungen bestimmt werden (Abbildung 36). Daraus lässt sich eine direkte Verbindung zwischen der Anreicherung der beschriebenen Transkriptionsfaktorbindingstellen und einer erhöhten Genexpression der zu diesen Bindingstellen assoziierten Transkriptionsfaktoren unter alkalischen pH-Bedingungen herstellen.

## 2.6 *RIM101*-abhängige Zielgenregulation durch pH

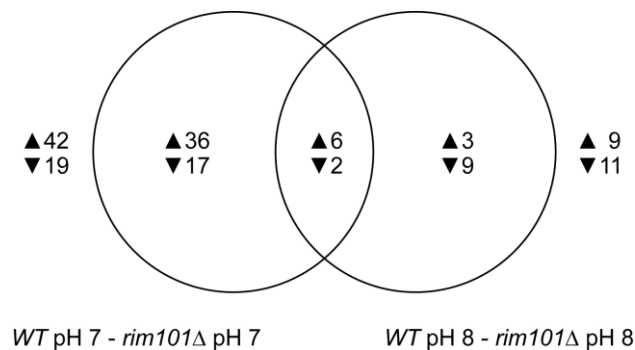
Nach der Untersuchung der Regulation der Transkriptionsrepressoren des Rim101-Signalwegs und von *FLO11* unter aziden pH-Bedingungen wurde nun der Fokus auf den neutralen und alkalischen pH-Bereich erweitert. So ist der PacC/CaRim101-Signalweg in *A. nidulans* bzw. *C. albicans* ein wichtiger Faktor für die Adaptation an alkalischen pH (Peñalva & Arst, 2004) und unterstützt im *S. cerevisiae* SK1-Stammhintergrund schwaches Wachstum auf Agar unter alkalischen Umgebungsbedingungen (Lamb & Mitchell, 2003). Wachstum unter alkalischen Bedingungen konnte im  $\Sigma$ 1278b-Stammhintergrund allerdings weder in Flüssigkultur, noch an Agar (Daten nicht gezeigt) bestätigt werden (vgl. Kapitel 2.4.1). Die Regulation des Rim101-Signalwegs unter neutralen und alkalischen pH-Bedingungen war für den *S. cerevisiae*  $\Sigma$ 1278b-Stammhintergrund bisher ebenso unbekannt wie zuvor unter aziden Umgebungsbedingungen. Durch die folgenden Untersuchungen sollte ein besseres Verständnis der Regulation des Rim101-Signalwegs, insbesondere seiner Transkriptionsrepressoren Rim101, Nrg1, Nrg2 und Smp1, sowie deren Einfluss auf die *FLO11*-Expression unter neutralen und basischen Umgebungsbedingungen gewonnen werden.

### 2.6.1 Transkriptomanalyse *RIM101*-abhängig exprimierter Gene unter neutralen und alkalischen Umgebungsbedingungen

Die Transkriptomanalyse der Vergleiche WT pH 7 - *rim101* $\Delta$  pH 7 und WT pH 8 - *rim101* $\Delta$  pH 8 resultierte in 61 bzw. 20 differentiell exprimierten Genen (Abbildung 37). Dies entspricht einer Abnahme um etwa den Faktor 3 *RIM101*-abhängig



exprimierter Gene von pH 7 nach pH 8 und deutet auf einen geringeren Einfluss der *RIM101*-abhängigen Genexpression unter alkalischen Bedingungen hin.



**Abbildung 37: Vergleichende Transkriptomanalyse WT pH 7 - *rim101*Δ pH 7 und WT pH 8 - *rim101*Δ pH 8**

Dargestellt sind die beiden Vergleiche WT pH 7 - *rim101*Δ pH 7 und WT pH 8 - *rim101*Δ pH 8. Es wurden für die Analyse nur Gene berücksichtigt, die unter den getesteten Bedingungen einen p-Wert  $\leq 0,06$ , eine um mindestens Faktor 2 veränderte Expression und eine absolute Expressionswertänderung  $\geq 10$  aufwiesen (erhobene Microarray-Expressionsdaten aus Kapitel 2.5). Außerhalb des Venn-Diagramms ist die Zahl der differentiell regulierten Gene der beiden Vergleiche angegeben. Innerhalb der Schnittmenge und der Teilmengen wird die Zahl regulierter Gene der jeweiligen Menge dargestellt. (Basis des jeweiligen Vergleichs ist die zuerst genannte Bedingung.)

In der gesamten Transkriptomanalyse wurde bis auf *RIM8* keine weitere bekannte Komponente des Rim101-Signalwegs oder von Genen, die für Regulatoren der *FLO11*-Expression kodieren, differentiell exprimiert (Tabelle 5). Die *RIM8*-Expression war im Vergleich WT pH 7 - *rim101*Δ pH 7 erhöht, was einen weiteren Hinweis auf die für *RIM8* beschriebene Feedback-Loop-Regulation durch Rim101 gibt (Lamb & Mitchell, 2003; Li & Mitchell, 1997) (vgl. Kapitel 1.6).

In Abwesenheit von *RIM101* zeigten sechs Gene sowohl unter pH 7 als auch pH 8 eine erhöhte Genexpression: *ALP1* (Arginin Transporter (Regenberg *et al.*, 1999)), *FDH1* (NAD<sup>+</sup>-abhängige Format-Dehydrogenase (Overkamp *et al.*, 2002)), *HSP32* (YPL277C & YPL278C – ORF, nicht charakterisiert), *POG1* (potentieller TF der die Rückkehr aus dem Pheromon-induzierten Arrest induziert (Leza & Elion, 1999)) und *SNO4* (YMR323W) (ORF, verifiziert - Protein unbekannter Funktion). *ENA5*, das für ein Protein mit Ähnlichkeit zu P-Typ ATPase Na<sup>+</sup>-Pumpen wie *ENA1* kodiert (Haro *et al.*, 1991; Wieland *et al.*, 1995), wurde als einziges Gen bestimmt, dessen Expression unter den gesetzten Analyseparametern in Abwesenheit von *RIM101* sowohl unter pH 7- als auch pH 8-Bedingungen erniedrigt war (Tabelle 5).

Insgesamt konnten in dieser Transkriptomanalyse zahlreiche Gene angereichert werden, deren *RIM101*-abhängige Genexpression bisher unbekannt war. Eine Anreicherung bestimmter funktioneller Kategorien war allerdings nicht möglich. Nur wenige Gene,

die *RIM101*-abhängig auch unter aziden Umgebungsbedingungen exprimiert werden, konnten auch in der vorliegenden Analyse bestimmt werden (Lamb & Mitchell, 2003; Mira *et al.*, 2009) (Tabelle 5).

**Tabelle 5: Anreicherung *RIM101*-abhängig exprimierter Gene unter pH 7 bzw. pH 8**

Dargestellt werden angereicherte *RIM101*-abhängig exprimierte Gene aus den Vergleichen WT pH 7 - *rim101Δ* pH 7 und WT pH 8 - *rim101Δ* pH 8 aus Abbildung 37 (p-Wert  $\leq 0,06$ ; um mindestens Faktor 2 veränderte Expression; absolute Expressionswertänderung  $\geq 10$ ). Rot bzw. türkis markierte Standardnamen stellen Gene dar, die auch unter aziden pH-Bedingungen in YPD (Lamb & Mitchell, 2003) bzw. MM4 (Mira *et al.*, 2009) *RIM101*-abhängig exprimiert werden. Schwarz markiert sind Standard- bzw. systematische Namen von Genen dargestellt, für die eine *RIM101*-abhängige Expression bisher nicht bekannt war.

| analysierte Menge  | Genexpression | Standardname (bzw. systematischer Name)  |
|--|---------------|--|
| WT pH 7 - <i>rim101Δ</i> pH 7                                  | erhöht        | <i>ARN1</i> , <i>CAR1</i> , <i>CBF1</i> , <i>COS3</i> , <i>CUE1</i> , <i>DDR48</i> , <i>ESBP6</i> , <i>FCY21</i> , <i>FRE4</i> , <i>FUS1</i> , <i>GAP1</i> , <i>GAT4</i> , <i>GIT1</i> , <i>HSP32</i> , <i>HXT11</i> , <i>INH1</i> , <i>MET2</i> , <i>MNN11</i> , <i>MNN4</i> , <i>MRL1</i> , <i>NDE1</i> , <i>PCA1</i> , <i>PGI1</i> , <i>PHM8</i> , <i>PTP3</i> , <i>RDR1</i> , <i>RIM8</i> , <i>RPS10B</i> , <i>SCW10</i> , <i>SOM1</i> , <i>STU2</i> , <i>THI4</i> , <i>TIP1</i> , <i>TSA2</i> , <i>TSC3</i> , <i>YPC1</i> |
|  | erniedrigt    | <i>BIO2</i> , <i>EXG2</i> (YDR261W-B, YDR261C-D), <i>FET4</i> , <i>FLO1</i> (YAR066W), <i>HSP104</i> , <i>MFA1</i> , <i>FLO11</i> , <i>PHO89</i> , <i>PUT4</i> , <i>RME1</i> , <i>RPL23A</i> , <i>SMF1</i> , <i>SPC110</i> , <i>UBP6</i> , <i>YAE1</i> , <i>YGP1</i>   |
| WT pH 7 - <i>rim101Δ</i> pH 7<br>WT pH 8 - <i>rim101Δ</i> pH 8 | erhöht        | <i>ALP1</i> , <i>FDH1</i> , <i>HSP32</i> ( <i>YPL277C</i> , <i>YPL278C</i> ), <i>POG1</i> , <i>SNO4</i> (YMR323W)  |
|  | erniedrigt    | <i>ENA5</i> , <i>RIM101</i>  |
| WT pH 8 - <i>rim101Δ</i> pH 8                                  | erhöht        | <i>FRQ1</i> , <i>MEI4</i> , <i>SNO4</i> (YMR322W)  |
|  | erniedrigt    | <i>AAD4</i> , <i>DAD2</i> , <i>GPD1</i> , <i>LSC2</i> , <i>PAU14</i> , <i>PHO91</i> , <i>REV3</i> , <i>SEN34</i> , <i>YPS5</i>   |

Lamb & Mitchell, 2003 (YPD - WT vs. *rim101Δ*) Mira *et al.*, 2009 (MM4 - WT vs. *rim101Δ*)

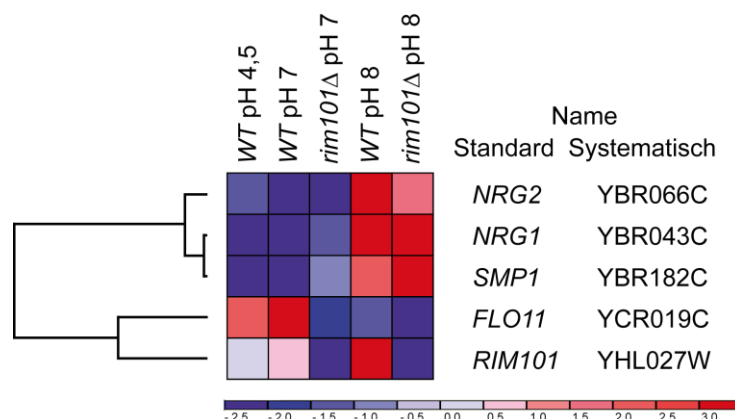
## 2.6.2 Regulation von Komponenten des Rim101-Signalwegs durch pH

Zunächst wurden die Expressionsdaten der Rim101-Signalwegskomponenten *RIM101*, *NRG1*, *NRG2*, *SMP1* und des Oberflächenflokkuin-Gens *FLO11* aus der Transkriptomanalyse (vgl. Kapitel 2.5) extrahiert und hierarchisch geclustert (Abbildung 38; Tabelle 6).

Die Expression der selektierten Gene wies unter pH 4,5 und pH 7 nur moderate Unterschiede auf. So war die Expression von *NRG1* und *SMP1* im Vergleich WT pH 4,5 - WT pH 7 kaum verändert und zeigte eine tendenzielle Abnahme zu pH 7 hin. Die *NRG2*-Expression nahm hier um etwa 40 % ab, wohingegen die *FLO11*- und *RIM101*-Expression um etwa 20 % bzw. 30 % zunahm (Tabelle 6).

In Abwesenheit von *RIM101* war unter pH 7 eine deutlich erhöhte Expression von *NRG1* (4,6-fach) und *SMP1* (13,4-fach) zu verzeichnen, wohingegen die *FLO11*-Expression (4,6-fach) und die *NRG2*-Expression moderat reduziert waren (Tabelle 6).

Dieses Ergebnis deutet auf eine deutlich *RIM101*-abhängige Regulation der *NRG1*-, *SMP1*- und *FLO11*-Expression hin.



**Abbildung 38: Hierarchisches Clustering von Komponenten des Rim101-Signalwegs und *FLO11***

Dargestellt ist das hierarchische Clustering der Gene, die für die Transkriptionsrepressoren Nrg1, Nrg2, Smp1, Rim101 und das Oberflächenflokkuin Flo11 kodieren. Die relevanten Expressionsdaten der Microarray-Versuchsansätze, WT pH 4,5, WT pH 7, WT pH 8, *rim101Δ* pH 7 und *rim101Δ* pH 8 (vgl. Kapitel 2.5) wurden extrahiert und für das hierarchische Clustering mittels GenePattern verwendet (Eisen *et al.*, 1998; Golub *et al.*, 1999; Reich *et al.*, 2006). Die relative Expressionsstärke der Signale wird durch den im Bild dargestellten Farbcode zum Ausdruck gebracht. Bei dieser Art der Darstellung (Eisen *et al.*, 1998) werden durch die rote Farbe Expressionswerte wiedergegeben, die über der durchschnittlichen Expression des Gens für alle Einzelexperimente liegen. Niedrigere Expressionswerte sind lila gekennzeichnet.

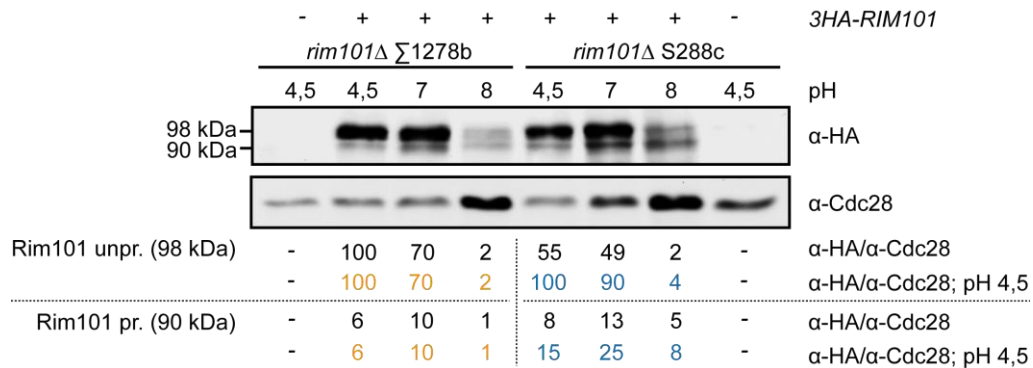
Der für pH 7 beschriebene regulatorische Effekt wurde unter pH 8 sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von *RIM101* völlig entkoppelt (Abbildung 38). Während die Expression von *RIM101* im Vergleich WT pH 7 - WT pH 8 2-fach zunahm, erhöhte sich die *NRG1*-, *NRG2*- und *SMP1*-Expression 24,4-, 5,7-, bzw. 35,8-fach. Im Gegensatz dazu war die *FLO11*-Expression unter diesen Bedingungen 4-fach reduziert. Die Abwesenheit von *RIM101* resultierte unter pH 8-Bedingungen in einer weiteren deutlichen Abnahme der *FLO11*-Expression (10-fach). Während die *NRG1*-Expression unverändert blieb, war die *NRG2*-Expression um etwa 34 % geringer, wohingegen die *SMP1*-Expression um 24 % zunahm.

**Tabelle 6: Expressionswerte von Genen aus dem Rim101-Signalweg und von *FLO11***

| Name          |              | WT pH 4,5 |       | WT pH 7 |       | <i>rim101Δ</i> pH 7 |      | WT pH 8 |       | <i>rim101Δ</i> pH 8 |      |
|---------------|--------------|-----------|-------|---------|-------|---------------------|------|---------|-------|---------------------|------|
| Standard      | Systematisch | EW        | SF    | EW      | SF    | EW                  | SF   | EW      | SF    | EW                  | SF   |
| <i>NRG2</i>   | YBR066C      | 549,3     | 7,8   | 318,9   | 48,7  | 263,3               | 15,8 | 1849,4  | 109,7 | 1215,6              | 92,0 |
| <i>NRG1</i>   | YBR043C      | 101,5     | 47,6  | 93,1    | 53,6  | 434,0               | 88,9 | 2274,5  | 61,2  | 2325,7              | 65,6 |
| <i>SMP1</i>   | YBR182C      | 63,7      | 3,5   | 46,9    | 3,1   | 631,7               | 61,4 | 1679,4  | 65,7  | 2230,0              | 52,6 |
| <i>FLO11</i>  | YCR019C      | 3936,8    | 351,8 | 4840,8  | 203,6 | 747,2               | 30,4 | 1026,2  | 189,3 | 101,4               | 3,4  |
| <i>RIM101</i> | YHL027W      | 672,4     | 14,1  | 944,2   | 32,8  | 2,6                 | 1,4  | 2277,3  | 196,8 | 6,8                 | 1,4  |

EW = Expressionswert; SF = Standardfehler

Um die Regulation der Transkriptionsrepressoren Nrg1, Nrg2, Smp1 und Rim101 unter pH 4,5, pH 7 und pH 8 zu analysieren, wurde ihre Proteinmenge mittels Immunoblot bestimmt.



**Abbildung 39: Der Transkriptionsrepressor Rim101 wird pH-abhängig reguliert.**

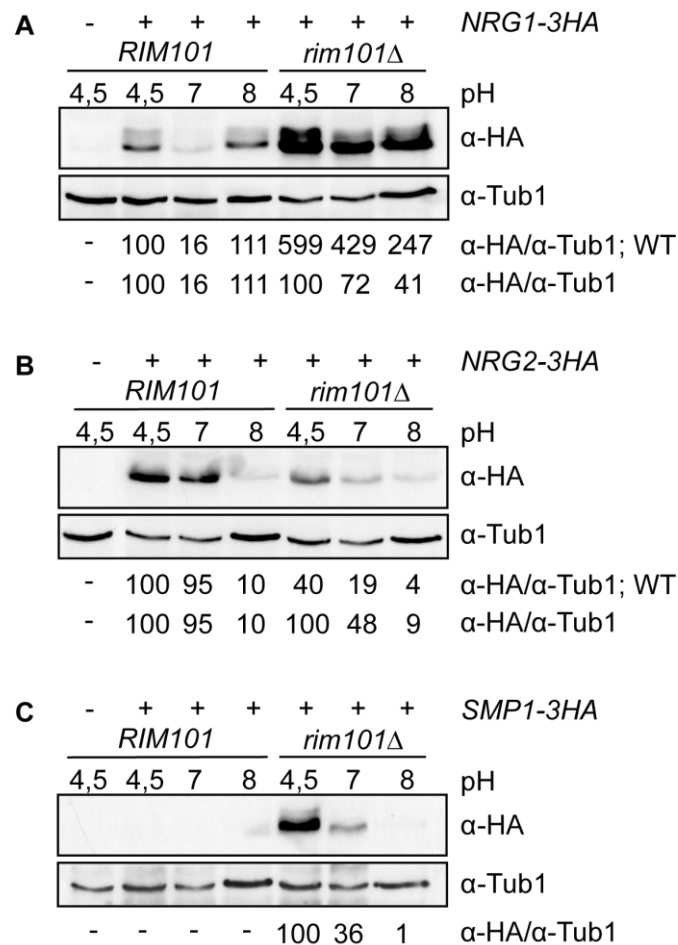
Immunoblot: Die *S. cerevisiae*-Stämme *rim101Δ* (YHUM1528, Σ1278b-Stammmhintergrund) und *rim101Δ* (YHUM1800, S288c-Stammmhintergrund) mit den Plasmiden B2799 (*CEN, LEU2*) bzw. BHUM1542 (*3HA-RIM101*) wurden in YNB bzw. YNB+His+Met+Ura bis zu einer  $OD_{600} = 0,7$  inkubiert und anschließend für weitere 3 h in entsprechend supplementiertem YNB-Medium unter pH 4,5, pH 7 bzw. pH 8 gepuffert (25 mM HEPES) weiterinkubiert. Der Transkriptionsrepressor 3HA-Rim101 wurde durch einen Antikörper gegen sein HA-Epitop detektiert (α-HA). Die 98 kDa-Bande liegt auf der Höhe des unprozessierten 3HA-Rim101, wohingegen prozessiertes 3HA-Rim101 auf der Höhe von 90 kDa läuft. Als interne Ladekontrolle diente das konstitutiv exprimierte Cdc28, die katalytische Untereinheit der Cyclin-abhängigen Protein-Kinase (α-Cdc28). Für die Quantifizierung wurde das Verhältnis von α-HA zu α-Cdc28 ermittelt (α-HA/α-Cdc28). Angaben in Prozent.

Für die Bestimmung des Einflusses des pH auf die Rim101-Proteinmenge wurde ein Plasmid, das für ein *3HA-RIM101* kodiert (Hayashi *et al.*, 2005), in eine *rim101*-Deletionsmutante des Σ1278b- und S288c-Stammmhintergrunds, einem der meist verwendeten *S. cerevisiae*-Laborstämme, eingebracht. In beiden Stammmhintergründen konnte unter pH 4,5- und pH 7-Bedingungen eine große Menge unprozessierten 3HA-Rim101 nachgewiesen werden. Die Menge an prozessiertem 3HA-Rim101 nahm im Vergleich von pH 4,5 zu pH 7 sowohl im Σ1278b- als auch im S288c-Stammmhintergrund um den Faktor ~1,7 auf 10 % bzw. 25 % der Menge unprozessierten 3HA-Rim101 unter pH 4,5 zu. Unter alkalischen Umgebungsbedingungen wurde in beiden Stammmhintergründen mit einer Abnahme von mindestens 96 % eine drastisch reduzierte Menge an 3HA-Rim101 im Vergleich zu den unter pH 4,5 bestimmten Proteinmengen bestimmt. Das Verhältnis der verbleibenden unprozessierten zur prozessierten 3HA-Rim101-Form glich sich im Σ1278b-Stammmhintergrund an, wohingegen das Verhältnis im S288c-Stammmhintergrund zur prozessierten 3HA-Rim101-Form zunahm. Insgesamt war die Menge an prozessiertem Rim101-3HA unter alkalischen Bedingungen jedoch erheblich geringer als unter aziden

Umgebungsbedingungen, was insgesamt eindeutig gegen eine durch alkalischen pH induzierte Rim101-Prozessierung in den untersuchten Stammhintergründen spricht.

Die gewonnenen Ergebnisse werden im S288c-Stammhintergrund durch vergleichbare Rim101-Mengen unter pH 5,5 und pH 7,5 bestätigt, wobei keine Daten unter alkalischem pH verfügbar sind (Hayashi *et al.*, 2005). Die unter pH 8 gewonnenen Ergebnisse für den  $\Sigma$ 1278b- und S288c-Stammhintergrund stehen jedoch in deutlichem Kontrast zu den Analysen im SK1-Stammhintergrund (Li & Mitchell, 1997). Die Menge an prozessiertem 3HA-Rim101 ist dort größer als die der unprozessierten Rim101-Form und unter pH 5,5 und pH 8 fast unverändert, mit tendenzieller Verschiebung zur prozessierten Form unter alkalischem pH.

Um sowohl den Einfluss von aziden, neutralen und alkalischen pH-Bedingungen als auch die *RIM101*-abhängige Regulation der Transkriptionsrepressoren Nrg1, Nrg2 und Smp1 zu überprüfen, wurden in einem Wildtypstamm und einer *rim101*-Deletionsmutante die offenen Leserahmen der Gene *NRG1*, *NRG2* und *SMP1* im 3'-Bereich mit einer 3HA-Sequenz markiert (Knop *et al.*, 1999). Für die drei Transkriptionsrepressoren Nrg1, Nrg2 und Smp1 konnte eine in höherem Maße *RIM101*-, als pH-abhängige Regulation der Proteinmenge nachgewiesen werden (Abbildung 40). Sowohl die Nrg1-3HA- als auch die Smp1-3HA-Menge war in Abwesenheit von *RIM101* generell erhöht, wohingegen sich die Menge an Nrg2-3HA reduzierte. Durch azide, neutrale und alkalische pH-Bedingungen erfolgte eine weitere differenzielle Regulation der Nrg1-3HA-, Nrg2-3HA- und Smp1-3HA-Expression. Die Menge an Nrg1-3HA war im Wildtypstamm unter pH 4,5 und pH 8 ähnlich hoch, zeigte jedoch unter pH 7 eine deutliche Reduktion. In einer *rim101* $\Delta$ -Mutante war die Nrg1-3HA-Menge unter pH 4,5 im Vergleich zum Wildtyp 6-fach erhöht und nahm über pH 7 nach pH 8 kontinuierlich, auf etwa das 2-fache ab (Abbildung 40 A). Die Menge an Nrg2-3HA war unter pH 4,5 und pH 7 im Wildtypstamm am höchsten, unter pH 8 jedoch kaum nachweisbar. Dieses Expressionsmuster war im Wildtypstamm stark, in der *rim101* $\Delta$ -Mutante schwächer ausgeprägt (Abbildung 40 B). Smp1-3HA konnte im Wildtypstamm nicht detektiert werden, wurde in der *rim101*-Deletionsmutante unter pH 4,5 jedoch stark exprimiert, mit einer Abnahme auf 36 % unter pH 7 und einer kaum nachweisbaren Proteinmenge unter pH 8 (Abbildung 40 C).



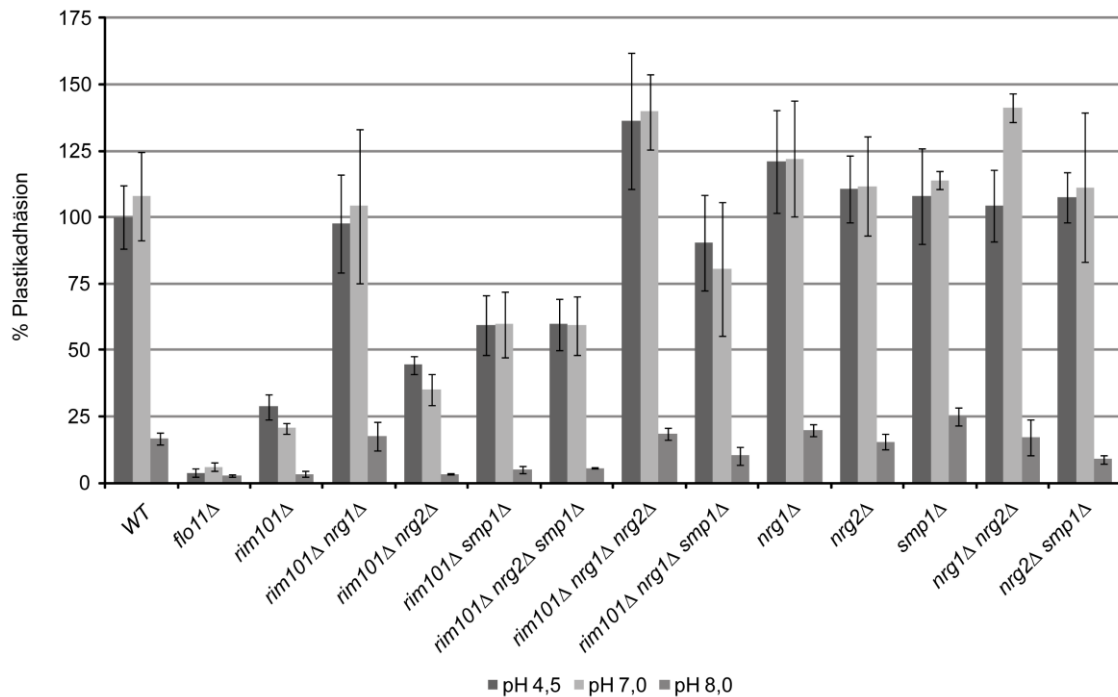
**Abbildung 40: Die Transkriptionsrepressoren Nrg1, Nrg2 und Smp1 werden Rim101- und pH-abhängig reguliert.**

Immunoblot: Die *S. cerevisiae*-Stämme YHUM0909 (WT) + B2445 (*CEN, URA3*), YHUM1578 (*NRG1-3HA*), YHUM1580 (*NRG2-3HA*), YHUM1582 (*SMP1-3HA*), YHUM1584 (*rim101Δ NRG1-3HA*), YHUM1586 (*rim101Δ NRG2-3HA*), YHUM1588 (*rim101Δ SMP1-3HA*) wurden in YNB-Medium bis zu einer  $OD_{600} = 0,7$  inkubiert und anschließend für weitere 3 h in YNB-Medium unter pH 4,5, pH 7 bzw. pH 8 gepuffert (25 mM HEPES) weiterinkubiert. Die Transkriptionsrepressoren wurden durch einen Antikörper gegen ihr HA-Epitop detektiert ( $\alpha$ -HA). Als interne Ladekontrolle diente das konstitutiv exprimierte Tub1 (Alpha-Tubulin) ( $\alpha$ -Tub1). Für die Quantifizierung wurde das Verhältnis von  $\alpha$ -HA zu  $\alpha$ -Tub1 ermittelt ( $\alpha$ -HA/ $\alpha$ -Tub1). Angaben in Prozent. Die Doppelbanden bei Nrg1-3HA und Smp1-3HA können auf unterschiedliche Phosphorylierungsstadien zurückgeführt werden (Berkey & Carlson, 2006; de Nadal *et al.*, 2003).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Regulation der Transkriptionsrepressoren des Rim101-Signalwegs im  $\Sigma 1278b$ -Stammhintergrund wesentlich komplexer erfolgt als bisher angenommen. Neben der bereits bekannten Regulation der Transkriptionsrepressoren Nrg1, Nrg2 und Smp1 in Abhängigkeit von *RIM101* (vgl. Kapitel 2.1.2; Abbildung 13) konnte nun auch eine pH-abhängige und Rim101-unabhängige Regulation dieser Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden.

### 2.6.3 Einfluss des Rim101-Signalwegs auf die pH-abhängige Adhäsion

Aus der Entdeckung, dass die Rim101-Proteinmenge unter alkalischem pH drastisch abnimmt, die Nrg1-Proteinmenge unter pH 4,5 und pH 8 unverändert ist und sowohl Nrg2 als auch Smp1 unter alkalischem pH im Wildtypstamm kaum bzw. nicht detektiert werden konnte, resultierte die Frage, ob der Rim101-Signalweg regulativ an der Flo11-abhängigen Adhäsion unter alkalischen pH-Bedingungen beteiligt ist.



**Abbildung 41: Quantitative Bestimmung der pH-abhängigen Adhäsion an Polystyrol unter verschiedenen pH-Bedingungen und Einfluss von Rim101-Signalwegskomponenten**

Die Stämme wurden in YNB+Ura-Medium bis zu einer  $OD_{600} = 0,7$  angezogen und anschließend in YNB+Ura-Medium (pH 4,5, pH 7 bzw. pH 8; 25 mM HEPES gepuffert) für weitere 3 h in Polystyrol-Mikrotiterplatten inkubiert. Die Adhäsionsfähigkeit der Wildtyp-Zellen unter pH 4,5 wurde gleich 100 % gesetzt. Die Testreihe zeigt den Durchschnitt von vier Messwerten. Verwendete Stämme: WT (YHUM0909), *flo11Δ* (YHUM0924), *rim101Δ* (YHUM1461), *rim101Δ nrg1Δ* (YHUM1522), *rim101Δ nrg2Δ* (YHUM1570), *rim101Δ smp1Δ* (YHUM1524), *rim101Δ nrg2Δ smp1Δ* (YHUM1576), *rim101Δ nrg1Δ nrg2Δ* (YHUM1564), *rim101Δ nrg1Δ smp1Δ* (YHUM1566), *nrg1Δ* (YHUM1459), *nrg2Δ* (YHUM1514), *smp1Δ* (YHUM1463), *nrg1Δ nrg2Δ* (YHUM1530) und *nrg2Δ smp1Δ* (YHUM1574).

Daher wurden die bereits unter aziden Bedingungen (vgl. Kapitel 2.1.2, Abbildung 15) getesteten Hefestämme mit Deletionskombinationen der Transkriptionsrepressorgene *NRG1*, *NRG2*, *SMP1* und *RIM101* nun auch unter neutralen und alkalischen Bedingungen auf ihre Adhäsionsfähigkeit hin überprüft. Als Kontrolle diente ein *flo11Δ*-Stamm, der nicht adhäsiv ist. Die Adhäsion des Wildtypstamms wurde gleich 100 % gesetzt, worauf sich alle Messergebnisse beziehen. Es zeigte sich, dass das Adhäsionsmuster unter pH 7 dem unter pH 4,5 bekannten nahezu gleicht (Abbildung 41). Der Adhäsionsverlust eines Stammes mit einer *rim101Δ*-Mutation konnte unter pH 4,5 und pH 7 in den getesteten

Doppel- und Dreifachmutanten supprimiert werden, die eine *nrg1*-Deletion trugen, wobei bereits das Vorhandensein allein dieser Mutation ausreichend war. In *rim101*-Deletionsmutanten, die zusätzlich lediglich Deletionen von *NRG2* und *SMP1* in Kombination trugen, konnte der Phänotyp einer *rim101Δ*-Mutante nur um etwa 50 % supprimiert werden. Die Inkubation unter pH 8 ergab für alle getesteten Hefestämme einen drastischen Adhäsionsverlust, wobei die verbleibende Adhäsion unter 25 % der Adhäsion des Wildtypstamms unter pH 4,5 lag. Der Adhäsionsverlust unter pH 8 erfolgt im  $\Sigma 1278b$ -Stammhintergrund somit Rim101-Signalweg-unabhängig.

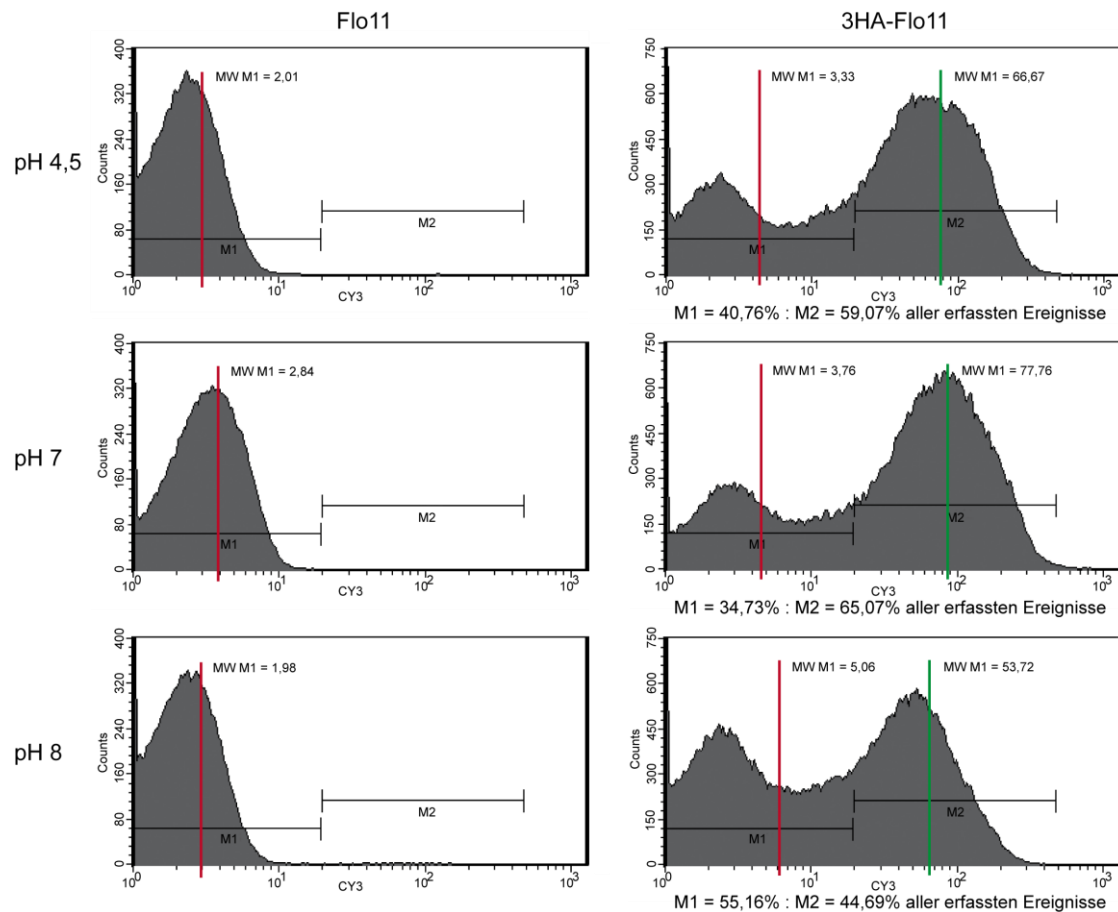
#### 2.6.4 Einfluss von pH auf die Flo11-vermittelte Adhäsion

Um ein besseres Verständnis von der pH-abhängigen Regulation der Adhäsion zu bekommen, wurde die Flo11-Menge an der Zelloberfläche mittels FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting) bestimmt. Hierfür wurde ein Hefestamm verwendet, in dem *FLO11* N-terminal nach der NSS (Nuclear Signaling Sequence) eine Sequenz trägt, die für eine 3HA-Markierung kodiert (Guo *et al.*, 2000). Als Kontrolle diente ein entsprechender Wildtypstamm (Abbildung 42, linke Diagramme). Ergebnis dieser Analyse war, dass die Zellen unter pH 4,5 und pH 7 ein ähnliches Fluoreszenzprofil aufwiesen, mit einer etwa um 14 % erhöhten mittleren Fluoreszenzintensität unter pH 7 (Abbildung 42, rechte Diagramme). Diese an der Oberfläche exponierte Menge an Flo11 ist für eine Adhäsion an Polystyrol-Plastik ausreichend, wie in Abbildung 41 unter vergleichbaren Bedingungen demonstriert werden konnte. Unter pH 8 nahm im Vergleich zu pH 4,5 die Zahl der nicht fluoreszent definierten Zellen um etwa 25 % ab. Dass die hiermit einhergehende Abnahme von Flo11 an der Zelloberfläche der alleinige Grund für den dramatischen Adhäsionsverlust ist, wie er für den Wildtypstamm unter pH 8 gezeigt werden konnte (Abbildung 41), scheint eher unwahrscheinlich.

Für eine genauere Analyse des pH-Einflusses auf die *FLO11*-Expression und die Flo11-vermittelte Adhäsion wurde ein Wildtypstamm mit jeweils einem von zwei *CEN*-Plasmiden transformiert, das *FLO11* entweder von seinem nativen Promotor aus exprimiert oder es von seiner regulären Kontrolle durch einen *PGK1*-Promotor entkoppelte. Als Kontrolle dienten ein Wildtyp- und ein *flo11Δ*-Stamm mit eingebrachtem Leervektor. Die verwendeten Stämme wurden unter den bereits beschriebenen

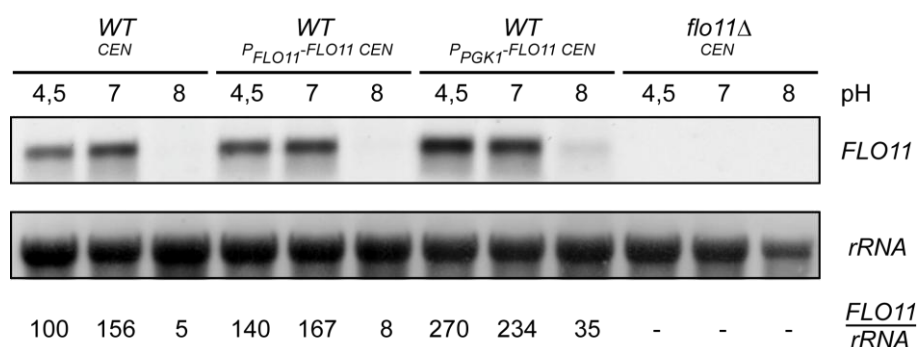


Bedingungen inkubiert und anschließend parallel sowohl die *FLO11*-Transkriptmenge (Abbildung 43) als auch die Adhäsion an Polystyrol-Plastik (Abbildung 44) bestimmt.



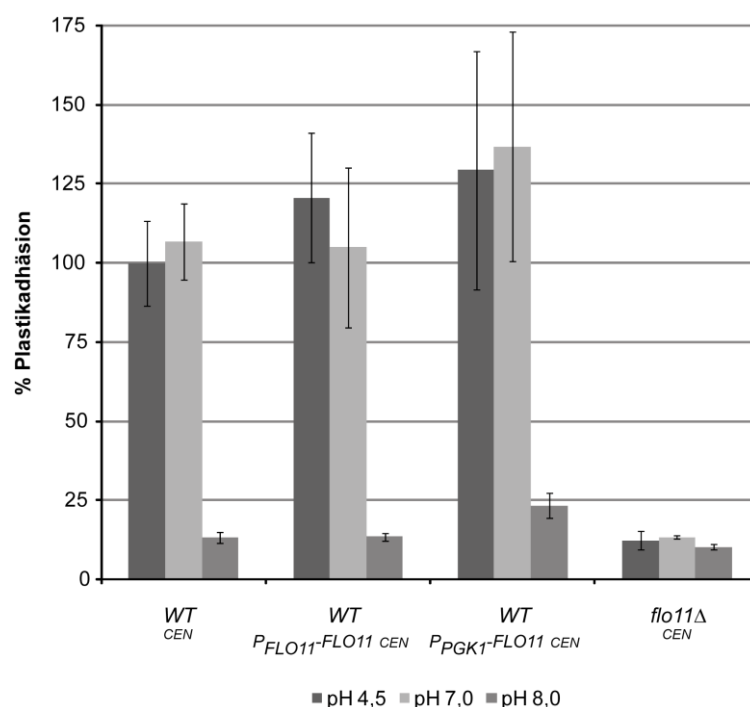
**Abbildung 42: FACS-Analyse des in Abhängigkeit von pH an der Zelloberfläche exponierten 3HA-Flo11**

Die Stämme *FLO11* (YHUM0216) und *3HA-FLO11* (YHUM1592) wurden von einer  $OD_{600} = 0,2$  bis zu einer  $OD_{600} = 0,7$  in YNB+His+Leu+Ura angezogen und anschließend für weitere 3 h in entsprechend supplementiertem YNB-Medium (pH 4,5, pH 7 bzw. pH 8; 25 mM HEPES gepuffert) weiterinkubiert. Für die FACS-Analyse wurden die Zellen mit 3,7 % Formaldehyd fixiert, mit einer Ultraschall-Sonde separiert und einem primären anti-HA und einem sekundären CY3-gelabelten Antikörper markiert. Um belastbare Ergebnisse zu bekommen, wurden von jeder Bedingung ~100.000 Zellen analysiert. Rote vertikale Linien geben die gemittelte Fluoreszenzintensität im Bereich M1, grüne vertikale Linien die gemittelte Fluoreszenzintensität im Bereich M2 wieder. Auf der X-Achse ist die gemessene Fluoreszenzintensität logarithmisch aufgetragen, die Y-Achse gibt die Zellzahl an. Die Zellen in den Diagrammen auf der linken Seite wurden als Kontrolle verwendet und als nicht fluoreszent definiert (Zellen im Bereich M1). Zellen mit 3HA markiertem Flo11 wurden im Bereich M2 als fluoreszent zusammengefasst (Zellen im Diagramm auf der rechten Seite). Kontrollen zur Verifizierung der Fluoreszenz-Spezifität wurden berücksichtigt (nicht gezeigt). Weitere Details im Text.



**Abbildung 43: Die *FLO11*-Transkriptmenge nimmt unter alkalischem pH ab.**

Transkript-Analyse: Die Stämme wurden in YNB-Medium bis zu einer  $OD_{600} = 0,7$  inkubiert und anschließend die Gesamt-RNA der für 3 h in YNB-Medium (pH 4,5, pH 7 bzw. pH 8; 25 mM HEPES gepuffert) weiterinkubierten *S. cerevisiae*-Stämme isoliert. Die Transkriptmengen von *FLO11* wurden durch eine Northern-Analyse, die *rRNA*-Menge durch Methylenblaufärbung bestimmt und für die Quantifizierung wurde das Verhältnis zur *rRNA* ermittelt. Unabhängig von der Art der *FLO11*-Expression (mit einer endogenen Kopie bzw. einer zusätzlichen *FLO11*-Kopie auf einem *CEN*-Plasmid, unter Kontrolle seines nativen Promotors oder entkoppelt durch den konstitutiven *PGK1*-Promotor) führte die Inkubation unter pH 8-Bedingungen zu einer dramatischen *FLO11*-Transkriptabnahme im Vergleich zu pH 4,5 und pH 7. Als Bezugsgröße diente der WT-Stamm unter pH 4,5-Bedingungen. Angaben in Prozent. Verwendete Stämme: WT (YHUM0909) und *flo11Δ* (YHUM0924) transformiert mit den Plasmiden B2445 (*CEN*, *URA3*), BHUM0778 (*P<sub>FLO11</sub>-FLO11-T<sub>FLO11</sub>*, *CEN*, *URA3*) bzw. BHUM1574 (*P<sub>PGK1</sub>-FLO11-T<sub>FLO11</sub>*, *CEN*, *URA3*).



**Abbildung 44: Unter alkalischen pH-Bedingungen kann der Adhäsionsverlust nicht kompensiert werden.**

Die gezeigten Stämme wurden in YNB-Medium bis zu einer  $OD_{600} = 0,7$  angezogen und anschließend in YNB-Medium (pH 4,5, pH 7 bzw. pH 8; 25 mM HEPES gepuffert) für weitere 3 h in Polystyrol-Mikrotiterplatten inkubiert. Die Adhäsionsfähigkeit der Wildtyp-Zellen mit Kontrollplasmid unter pH 4,5 wurde gleich 100 % gesetzt. Die Testreihe zeigt den Durchschnitt von vier Messwerten. Der Adhäsionsverlust des Wildtypstamms unter pH 8 wurde durch eine zusätzliche *FLO11*-Kopie auf einem *CEN*-Plasmid, unter Kontrolle seines nativen Promotors bzw. entkoppelt durch den konstitutiven *PGK1*-Promotor nicht kompensiert. Verwendete Stämme: WT (YHUM0909) und *flo11Δ* (YHUM0924), transformiert mit den Plasmiden B2445 (*CEN*, *URA3*), BHUM0778 (*P<sub>FLO11</sub>-FLO11-T<sub>FLO11</sub>*, *CEN*, *URA3*) bzw. BHUM1574 (*P<sub>PGK1</sub>-FLO11-T<sub>FLO11</sub>*, *CEN*, *URA3*).

Ergebnis dieser Analysen war, dass sowohl das *FLO11*-Transkript als auch die Flo11-vermittelte Adhäsion unter pH 8 im Vergleich zu pH 4,5 und pH 7 drastisch reduziert ist (Abbildung 43, Abbildung 44). Diese Effekte konnten im Wildtypstamm auch nicht durch eine zusätzliche *FLO11*-Kopie auf einem *CEN*-Plasmid kompensiert werden - weder unter Kontrolle seines nativen Promotors, noch entkoppelt durch den konstitutiv aktiven *PGK1*-Promotor.

Zusammenfassend stellt sich die Regulation wie folgt dar (Tabelle 7): Sowohl *FLO11*-Transkript (Abbildung 43) als auch Flo11-vermittelte Adhäsion (Abbildung 44) zeigen eine deutliche Reduktion unter alkalischem pH. Dies geht jedoch nicht mit einem ebenso starken Flo11-Verlust an der Zelloberfläche einher. Dieser ist vielmehr nur geringfügig reduziert (Abbildung 42). Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass das Protein durch alkalischen pH direkt beeinflusst wird und seine adhäsiven Eigenschaften verliert.

**Tabelle 7: Zusammenfassung Adhäsionsregulation unter pH 4,5, pH 7 und pH 8**

| <i>WT</i>                  | pH 4,5 | pH 7 | pH 8 |
|----------------------------|--------|------|------|
| <i>FLO11</i> -Transkript   | ++     | +++  | -    |
| exponiertes 3HA-Flo11      | +++    | +++  | ++   |
| Flo11-vermittelte Adhäsion | +++    | +++  | -    |

## 2.7 pH-abhängige Ausbildung adhäsiver Strukturen/Biofilme

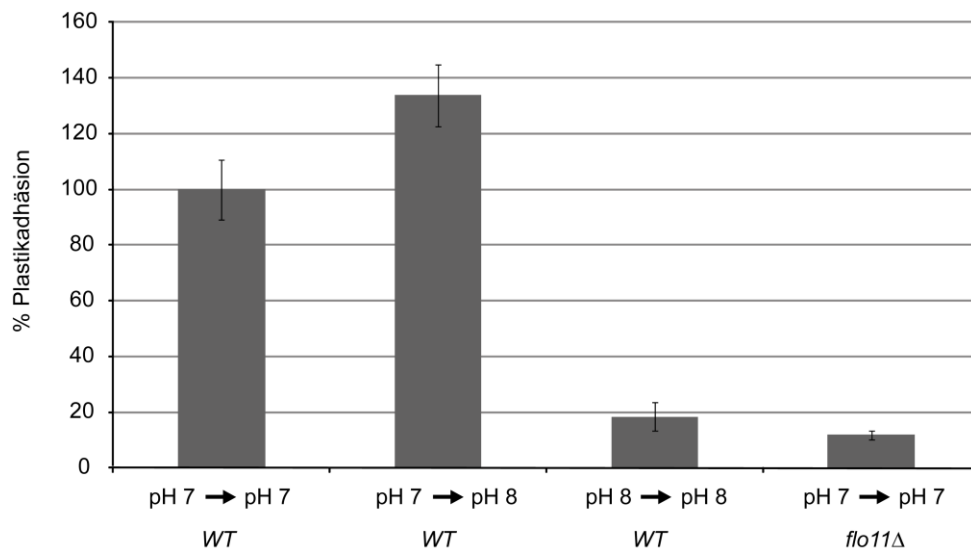
Ein Schutz vor extremen äußeren Bedingungen bieten Biofilme, die meist aus funktionell und architekturell differenzierten mikrobiellen Gemeinschaften bestehen, die in einer extrazellulären polymeren Matrix (meist Polysaccharid-reich) eingebettet sind und sowohl an biotische als auch abiotische Oberflächen haften. So sind z. B. Bakterien und *C. albicans*-Zellen in Biofilmen gegenüber antimikrobiellen Agenzien geschützt (Brown & Gilbert, 1993; Costerton *et al.*, 1987; Hawser & Douglas, 1995). In der humanpathogenen Hefe *C. albicans* reicht bereits der physikalische Kontakt zu einer Oberfläche aus, um die Mitogen-aktivierte Protein-Kinase CaMkc1 zu aktivieren, die wiederum die Adhäsion und Biofilmbildung initiiert (Kumamoto, 2005). Für *S. cerevisiae* ist die Bedeutung des Flokkulins Flo11 für die Ausbildung von Biofilmen bekannt (Reynolds *et al.*, 2008; Reynolds & Fink, 2001), wobei die genaue Aufgabe und Schutzfunktion des Biofilms bisher unklar blieb. Man geht davon aus, dass für die

Flo11-vermittelte Biofilmbildung die Zelloberflächen-Hydrophobizität kritisch ist, da sie die Reibung zwischen Kolonie und Agaroberfläche herabsetzt. Zudem üben Glucose-Mangelbedingungen einen positiven Effekt auf die Biofilmbildung aus, da unter diesen Bedingungen die *FLO11*-Transkription erhöht ist (Reynolds & Fink, 2001). So zeigten Untersuchungen auf halbfestem Agar (0,3 % Agaranteil), dass die durch das Wachstum entstehenden Kräfte innerhalb der Kolonie zu einer Ausbreitung der Zellen über die Agaroberfläche beitragen, wobei der Biofilm konzentrische Kreise eines Glucose- und pH-Gradienten aufbaut, der die Differenzierung des Biofilms unterstützt. Während im Zentrum des Biofilms ein sehr azider pH gemessen wird (pH 4,7), steigt er außerhalb des Biofilms an (pH 5,8) (Reynolds *et al.*, 2008; Reynolds & Fink, 2001). In den folgenden Experimenten wurde nun im Detail untersucht, welcher Einfluss von neutralen und alkalischen pH-Bedingungen auf die Ausbildung adhäsiver Strukturen ausgeht, da, wie in Abbildung 41 und Abbildung 44 dargestellt wurde, die Adhäsion des Wildtypstamms an Polystyrol-Plastik unter pH 7 am stärksten ausgeprägt, unter pH 8 jedoch extrem reduziert war.

### **2.7.1 Ein unter neutralen Bedingungen ausgebildeter adhäsiver Kontakt ist in alkalischem Milieu stabil**

Ziel des folgenden Versuchs war es, zu überprüfen, ob Hefezellen einen unter neutralen Bedingungen ausgebildeten adhäsiven Kontakt an Polystyrol-Plastik durch Änderung der Umgebungsbedingungen nach pH 8 verlieren oder ob die ausgebildeten adhäsiven Strukturen stabil sind. Der verwendete Wildtypstamm wurde in YNB+Ura bis zu einer  $OD_{600} = 0,7$  angezogen und anschließend für weitere 3 h in YNB+Ura, pH 7 bzw. pH 8, 25 mM HEPES gepuffert, in Polystyrol-Mikrotiterplatten weiterinkubiert. Danach erfolgte der Austausch des Mediums gegen pH 8 bzw. pH 7 gepuffertes Medium, gefolgt von einer weiteren dreistündigen Inkubation. Es zeigte sich, dass eine unter neutralen Bedingungen Flo11-abhängig ausgebildete Adhäsion an Polystyrol-Plastik durch Änderung der Umgebungsbedingungen in den alkalischen Bereich nicht reversibel ist (Abbildung 45). Ein unter neutralen Bedingungen ausgebildeter adhäsiver Kontakt scheint unter alkalischen pH-Bedingungen vielmehr positiv beeinflusst zu werden, möglicherweise durch die Bildung biofilmartiger Strukturen. So ist die Plastik-Adhäsion des Wildtypstamms unter den Versuchsbedingungen pH 7→pH 8 im Vergleich zu pH 7→pH 7 um 34 % erhöht. Die Wahl alkalischen Mediums als

Erstinkubationsbedingung führte hingegen zu einem extremen Adhäsionsverlust, ähnlich dem eines *flo11Δ*-Kontrollstamms unter pH 7 (Abbildung 45). Eine mögliche Erklärung für diese Effekte wäre zum einen eine Flo11-unabhängige Zell-Verklumpung in alkalischem Milieu, zum anderen deuten die gewonnenen Ergebnisse darauf hin, dass Flo11 unter pH 8-Bedingungen derart verändert wird, dass die Ausbildung eines adhäsiven Kontaktes an Polystyrol-Plastik nicht mehr möglich ist.

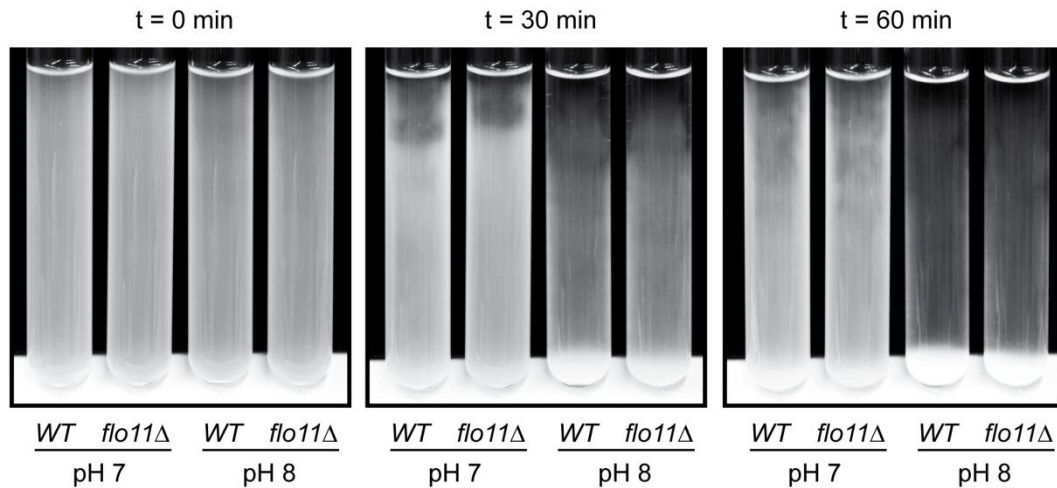


**Abbildung 45: Ein unter neutralen Bedingungen ausgebildeter adhäsiver Kontakt ist in alkalischem Milieu stabil.**

Die Stämme wurden in YNB+Ura-Medium bis zu einer  $OD_{600} = 0,7$  angezogen und anschließend in YNB+Ura-Medium (pH 7 bzw. pH 8; 25 mM HEPES gepuffert) für weitere 3 h in Polystyrol-Mikrotiterplatten inkubiert. Danach erfolgte ein Austausch des Mediums gegen pH 7 oder pH 8 gepuffertes Medium und eine weitere Inkubation für 3 h. Die Adhäsionsfähigkeit der Wildtyp-Zellen, die zweimal unter pH 7 inkubiert wurden, wurde gleich 100 % gesetzt. Die Testreihe zeigt den Durchschnitt von sechs Messwerten. Verwendete Stämme: WT (YHUM0909) und *flo11Δ* (YHUM0924).

### 2.7.2 pH 8-abhängige Sedimentation erfolgt Flo11-unabhängig

Um die Auswirkungen von alkalischem Milieu auf eine Flo11-unabhängige Zell-Verklumpung zu untersuchen, wurden ein Wildtyp- und *flo11Δ*-Stamm in YNB+Ura bis zu einer  $OD_{600} = 0,7$  angezogen, auf eine  $OD_{600} = 2$  aufkonzentriert und in YNB+Ura-Medium pH 7 bzw. pH 8 gepuffert (25 mM HEPES) für 3 h ruhend in Reagenzgläsern inkubiert. Nach kurzem Vortexen wurden die Zellen einem einstündigen Sedimentationstest unterzogen (Abbildung 46). Das Ergebnis dieser qualitativen Analyse war eine Flo11-unabhängige, durch alkalischen pH induzierte Sedimentation flockenartig verklumpter Zellen, die unter pH 7 nicht erkennbar war.



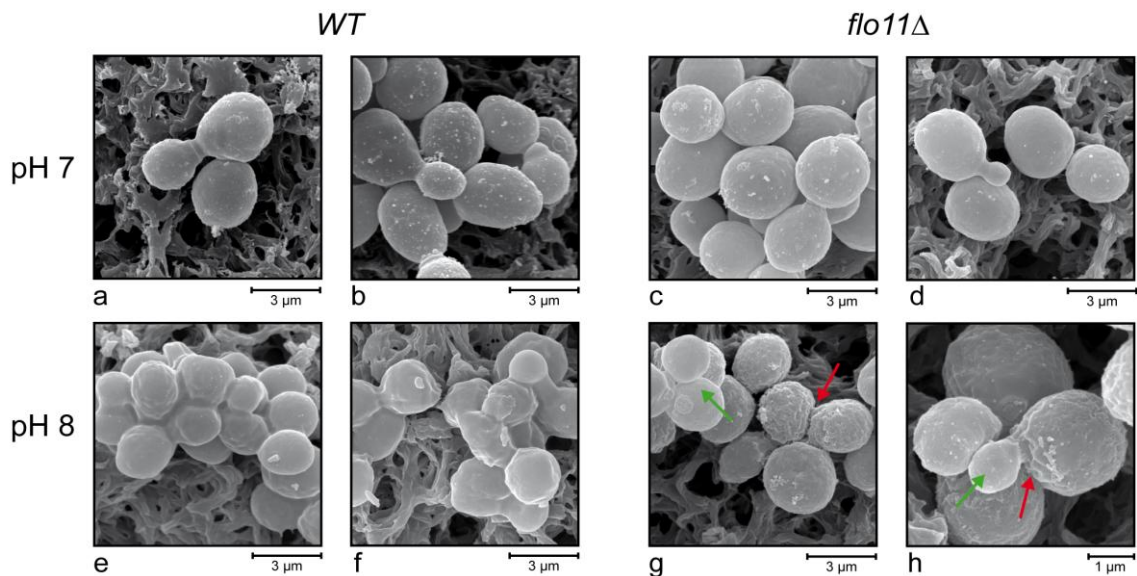
**Abbildung 46: Hefezellen sedimentieren unter pH 8-Bedingungen Flo11-unabhängig.**

Für diesen qualitativen Sedimentationstest wurden ein Wildtyp- (YHUM0909) und ein *flo11Δ*-Stamm (YHUM0924) in YNB+Ura-Medium bis zu einer  $OD_{600} = 0,7$  angezogen und anschließend in YNB+Ura-Medium bei pH 7 bzw. pH 8 (25 mM HEPES gepuffert) für 3 h ruhend in Reagenzgläsern inkubiert. Nach kurzem Vortexen wurden die Zellen einem einstündigen Sedimentationstest unterzogen. Abgebildet ist die Zell-Sedimentation zu den Zeitpunkten  $\Delta t = 0$  min,  $\Delta t = 30$  min und  $\Delta t = 60$  min.

### 2.7.3 Veränderung der Zelloberfläche durch alkalischen pH

Der Befund, dass die Inkubation unter pH 8-Bedingungen zu einer Flo11-unabhängigen Sedimentation führt, legt nahe, dass alkalischer pH die Hefezelloberfläche derart verändert, dass es zu einer Zellzusammenlagerung kommt, die unter pH 7-Bedingungen nicht induziert wird. Um dies zu überprüfen, wurden ein Wildtyp- und ein *flo11Δ*-Stamm einer Scan-Elektronenmikroskopie nach dreistündiger Inkubation unter pH 7- bzw. pH 8-Bedingungen unterzogen. So zeigte sich unter pH 7-Bedingungen für Wildtyp- (Abbildung 47 a & b) und *flo11Δ*-Stämme (Abbildung 47 c & d) eine typische Zell- und Oberflächenmorphologie vegetativ wachsender Hefezellen. Beide Stämme unterschieden sich unter diesen Wachstumsbedingungen optisch nicht voneinander und lagen für gewöhnlich separiert oder als knospende Zellen vor. Alkalischer pH führte sowohl beim Wildtypstamm als auch in der *flo11*-Deletionsmutante zu einer deutlichen Änderung der Oberflächen- und Zellmorphologie. So lag der Wildtypstamm unter pH 8-Bedingungen fast ausschließlich in Zellgruppen vor, die Gallert-artig überzogen waren (Abbildung 47 e & f). Diese Gallert-artige Struktur wurde lediglich bei den Wildtypzellen beobachtet und war beim *flo11*-Deletionsstamm nicht vorhanden, was für eine Flo11-abhängige Ausbildung dieser Struktur spricht. Der *flo11*-Deletionsstamm zeigte bei älteren Zellen eine überwiegend raue, strukturierte Oberfläche, während Knospen

und junge Tochterzellen eine glatte Oberflächenstruktur aufwiesen (grüne Pfeile). Die Zellen lagen auch hier meist in paketähnlichen Strukturen vor (Abbildung 47 g & h). Die Zelloberfläche erschien am Zellübergang oft fransig eingerissen (rote Pfeile). Die Bildung einer polymeren Matrix, vergleichbar zu Biofilmen, schließen die gewonnenen Ergebnisse eher aus, da im *flo11*-Deletionsstamm keine ähnliche Gallertartige Oberfläche wie im Wildtypstamm nachgewiesen werden konnte.



**Abbildung 47: Zelloberflächenveränderung unter alkalischem pH**

Scan-Elektronenmikroskopie: Der Wildtyp- (YHUM0909) und *flo11Δ*-Stamm (YHUM0924) wurden in YNB+Ura-Medium bis zu einer  $OD_{600} = 0,7$  angezogen und anschließend in YNB+Ura-Medium bei pH 7 bzw. pH 8 (25 mM HEPES gepuffert) für 3 h inkubiert. Die Zell-Fixierung erfolgte mit Formaldehyd und Osmiumtetroxid. Grüne Pfeile markieren Knospen bzw. junge Tochterzellen. Rote Pfeile markieren die fransig eingerissene Zelloberfläche im Bereich des Zellübergangs.

Zusammenfassend ergibt sich aus den in Kapitel 2.6.4 und 2.7 gewonnenen Ergebnissen, dass Flo11 für die Adhäsion des Biofilms an Oberflächen unter pH 4,5 und pH 7 wichtig ist, unter pH 8-Bedingungen aber keine Flo11-abhängige Oberflächenadhäsion *de novo* ausgebildet werden kann. Eine bereits in neutralem Milieu etablierte Zell-Oberflächenadhäsion ist unter pH 8 jedoch stabil. Alkalische pH-Bedingungen induzieren allerdings eine Flo11-unabhängige Zell-Zell-Interaktion, die zu einer Zell-Verklumpung führt.

### 3 Diskussion

#### 3.1 Regulation des adhäsiven Wachstums durch den Rim101-Signalweg unter vegetativen Wachstumsbedingungen

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss des Rim101-Signalwegs auf das haploid adhäsive Wachstum und seine diesbezügliche regulatorische Funktion im  $\Sigma 1278b$ -Stammhintergrund untersucht. Ausgangspunkt dieser Analyse war, dass Rim101 ein positiver Regulator des haploid adhäsiven Wachstums ist, wobei eine Deletion von *RIM101* zu einem Verlust des adhäsiven Wachstums führt (Li & Mitchell, 1997). Durch ChIP-Analysen wurde bereits festgestellt, dass Rim101 u. a. mit den Promotorregionen von *NRG1* und *SMP1* assoziiert und diese reprimiert (Lamb & Mitchell, 2003). Nrg1 und Nrg2, das in seiner Zinkfinger-DNA-Bindedomäne eine große Homologie zu Nrg1 aufweist (Vyas *et al.*, 2001), sind beide als Repressoren von *FLO11* bekannt, wobei der Nrg1- und Nrg2-abhängigen *FLO11*-Repression durch die Snf1-Kinase, der zentralen Komponente des Glucose-Repressions-Signalwegs, antagonistisch entgegengewirkt wird (Kuchin *et al.*, 2002; Kuchin *et al.*, 2003). Während der nicht adhäsive Phänotyp einer *rim101*-Deletionsmutation im SK1-Stammhintergrund durch eine *smp1 $\Delta$* -Mutation supprimiert wird, konnte dies für eine *nrg1 $\Delta$* -Mutation nicht bestätigt werden (Lamb & Mitchell, 2003). Es stellte sich die Frage, welche regulatorische Funktion die beschriebenen Transkriptionsrepressoren im  $\Sigma 1278b$ -Stammhintergrund einnehmen. Die Untersuchungen ergaben, dass Nrg1, Nrg2 und Smp1 neben weiteren, bisher nicht mit Rim101 in Zusammenhang gebrachten Faktoren an der Regulation der Flo11-vermittelten Adhäsion unter vegetativen Wachstumsbedingungen beteiligt sind.

##### 3.1.1 Die Transkriptionsrepressoren Nrg1, Nrg2 und Smp1 regulieren das Flo11-abhängige Wachstum in Abhängigkeit von Rim101

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Adhäsionsverlust einer *rim101*-Deletionsmutante von dem Oberflächenflokkuin Flo11 abhängig ist. Dieser Befund wird durch die Tatsache unterstützt, dass alle weiteren in *S. cerevisiae* bekannten Flokkulingene, *FLO1*, *FLO5*, *FLO9* und *FLO10*, in der Nähe der Telomerregion der sie tragenden Chromosomen kodieren und dadurch epigenetisch stillgelegt sind (Halme *et al.*, 2004). Epistatische Analysen ergaben, dass im  $\Sigma 1278b$ -Stammhintergrund der Adhäsionsverlust einer *rim101*-Deletionsmutation sowohl durch



eine *nrg1Δ*-Mutation als auch eine *nrg2Δ smp1Δ*-Doppelmutation supprimiert werden kann, was bisher unbekannt war. Nrg1, Nrg2 wie auch Smp1 nehmen im Rim101-Signalweg als Transkriptionsrepressoren des adhäsiven Wachstums also eine wichtige Rolle ein und werden alle Rim101-abhängig reguliert. Während *NRG1* und *SMP1* direkt über ihre Promotoren durch Rim101 reprimiert werden (Lamb & Mitchell, 2003), ist die Menge an Nrg2 in Gegenwart von Rim101 erhöht. Letztere Regulation erfolgt wahrscheinlich indirekt über weitere bisher unbekannte Faktoren, da eine Rim101-Bindestelle im *NRG2*-Promotor bislang nicht nachgewiesen werden konnte. Insgesamt deuten die gewonnenen Resultate darauf hin, dass die Rim101-abhängige Zielgen-Regulation im Fall von *FLO11* innerhalb der verwendeten *S. cerevisiae*-Stammhintergründe nicht identisch ist. So wird der nicht adhäsive Phänotyp einer *rim101*-Deletionsmutation im *S. cerevisiae* SK1-Stammhintergrund bereits durch eine *smp1Δ*-Mutation völlig supprimiert, wohingegen eine *rim101Δ nrg1Δ*-Doppelmutante einen nicht adhäsiven Phänotyp aufweist (Lamb & Mitchell, 2003). Wie genau diese regulatorischen Unterschiede zustande kommen, ist bisher unklar und bedarf weitergehender Analysen.

Während der Adhäsionsverlust einer *rim101*-Deletionsmutation durch eine *nrg1Δ*-Mutation sowohl an Agar (YNB+Ura und SC+Ura) als auch an Polystyrol-Plastik supprimiert wird, ist eine erfolgreiche Suppression einer *rim101Δ*-Mutation durch eine *nrg2Δ smp1Δ*-Doppelmutation von den angelegten Versuchsbedingungen abhängig:

So wird der Adhäsionsverlust einer *rim101*-Deletionsmutation auf YNB+Ura-Agar in einer *rim101Δ nrg2Δ smp1Δ*-Dreifachmutante komplett supprimiert, die Adhäsion auf SC+Ura-Agar ist hingegen stark reduziert. Die zusätzliche Deletion von *NRG2* und *SMP1* scheint diese Mutante sensitiv gegenüber der Supplementation mit Aminosäuren zu machen, was in einem deutlich nachweisbaren Adhäsionsverlust resultiert. Dieses Ergebnis könnte auf eine bislang nicht bekannte Rolle von Nrg2 und Smp1 im Aminosäuremetabolismus hinweisen. Bisher ist bekannt, dass durch Aminosäuremangelbedingungen die Regulation verschiedener UAS- und URS-Elemente im *FLO11*-Promotor eines Wildtypstamms derart verändert werden, dass das adhäsive Wachstum sogar in Gegenwart präferierter Kohlenstoff- und Stickstoffquellen effizient induziert werden kann (Braus *et al.*, 2003; Niederberger *et al.*, 1981). Hierbei wird sowohl die *FLO11*-Expression unter Aminosäuremangelbedingungen, als auch die basale *FLO11*-Expression, wahrscheinlich indirekt über Gcn4, eine Komponente des

Generelle-Aminosäure-Signalwegs, reguliert (Braus *et al.*, 2003). Es wäre denkbar, dass dieses Regulationsmuster in Abwesenheit von *NRG2* und *SMP1* bei gleichzeitigem Aminosäureüberangebot revertiert und über die Aminosäure-abhängig regulierten UAS- und URS-Elemente eine *FLO11*-Repression erfolgt, aus der ein Adhäsionsverlust resultiert.

Die Adhäsionseigenschaften der *rim101Δ nrg2Δ smp1Δ*-Dreifachmutante an Polystyrol-Plastik und Agar (YNB+Ura-Medium) waren verschieden. Der Effekt der Deletion von *NRG2* und *SMP1* in einer *rim101Δ*-Mutante konnte bei der dreistündigen Inkubation an Polystyrol-Plastik wahrscheinlich durch den Transkriptionsrepressor Nrg1 kompensiert werden, dessen Proteinmenge in Abwesenheit von *RIM101* stark erhöht war und so zu der 50 % reduzierten Adhäsion im Vergleich zum Wildtypstamm führte. Dieses Adhäsionsergebnis an Polystyrol steht im Kontrast zu der qualitativ identischen Adhäsion des Wildtypstamms und der *rim101Δ nrg2Δ smp1Δ*-Dreifachmutante an Agar. Eine Erklärung für diesen Effekt ergibt sich aus der Tatsache, dass die Nährstoffversorgung auf einer Agarplatte limitiert ist und die Verfügbarkeit von Glucose im Laufe der Inkubation abnimmt. Unter Glucosemangelbedingungen wird die zentrale Komponente des Glucose-Repressionswegs, die Kinase Snf1, aktiviert (Celenza & Carlson, 1989; Wilson, 1996) und führt hier zu einer Repression des Transkriptionsfaktors Nrg1 (Kuchin *et al.*, 2002; Kuchin *et al.*, 2003). So konnte unter Glucosemangel der Kernimport der katalytischen Untereinheit Snf1 des Kinasekomplexes gezeigt werden (Vincent *et al.*, 2001). Außerdem interagiert Snf1 neben Nrg1 auch mit Nrg2 und kann wahrscheinlich auch diesen Transkriptionsfaktor reprimieren, wobei jedoch eine direkte Phosphorylierung nicht nachgewiesen werden konnte (Vyas *et al.*, 2001).

### 3.1.2 Die Rolle weiterer Faktoren bei der *RIM101*-abhängig regulierten Adhäsion

Neben den Transkriptionsrepressoren Nrg1, Nrg2 und Smp1 konnten weitere Faktoren bestimmt werden, die in Abhängigkeit von *RIM101* das haploid adhäsive Wachstum regulieren:

Für *S. cerevisiae* wird der  $\text{Ca}^{2+}$ -Calcineurin-Crz1-Signalweg neben dem Rim101-Signalweg als ein weiteres Sensorsystem für alkalischen pH beschrieben (Kullas *et al.*, 2007; Serrano *et al.*, 2002). Die Bedeutung von Calcineurin in der Toleranz gegenüber

hohen pH-Bedingungen wurde über eine Calcineurin-Inhibition nachgewiesen, die im Wildtypstamm die Zellsensitivität gegenüber alkalischem pH erhöhte (Mendoza *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 1993). Die Serin-/Threonin-Proteinkinase Calcineurin ist ein Heterodimer, das sich aus einer der beiden redundanten katalytischen Untereinheiten Cna1 und Cna2, sowie der regulatorischen Untereinheit Cnb1 zusammensetzt (Cyert, 2003). Die Aktivierung von Calcineurin reguliert die Expression zahlreicher unter alkalischem pH exprimierter Gene, wie z. B. *ENA1*, das für eine P-Typ Na<sup>+</sup>-Pumpe kodiert, die unter anderem für das Wachstum unter alkalischen Bedingungen benötigt wird (Haro *et al.*, 1991), und *PHO89*, das für einen Na<sup>+</sup>/Pi-Co-Transporter kodiert (Serrano *et al.*, 2002; Viladevall *et al.*, 2004; Yoshimoto *et al.*, 2002). Dies geschieht hauptsächlich durch die Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors Crz1, der über CDRE (Calcineurin Dependent Response Elements) an Calcineurin-abhängig regulierte Promotoren bindet (Cyert, 2003; Matheos *et al.*, 1997; Mendizabal *et al.*, 1998; Stathopoulos & Cyert, 1997). Unter alkalischem pH findet eine sehr schnelle Calcium-Aufnahme statt (Viladevall *et al.*, 2004), die zu einer Aktivierung von Calcineurin und subsequent zu einer Lokalisierung des Transkriptionsfaktors Crz1 in den Nukleus führt, wo er die Zielgenexpression induziert (Ruiz & Ariño, 2007). Obwohl, wie im Fall von *ENA1*, eine gemeinsame Zielgenregulation sowohl durch den Rim101-Signalweg, durch Repression von *NRG1*, als auch durch den Ca<sup>2+</sup>-Calcineurin-Crz1-Signalweg über Calcineurin und Crz1 bekannt ist (Lamb & Mitchell, 2003; Lamb *et al.*, 2001; Platara *et al.*, 2006; Serrano *et al.*, 2002), gab es bislang keine Hinweise auf einen gemeinsamen regulatorischen Einfluss beider Signalwege auf die *FLO11*-Expression unter aziden Bedingungen. Um eine Quervernetzung beider Signalwege zu überprüfen, wurde eine Doppelmutante durch Deletion der regulatorischen Untereinheit *CNB1* der heterodimeren Serin-/Threoninkinase Calcineurin in Kombination mit einer *RIM101*-Deletion generiert. Ergebnis dieser Analyse war die erfolgreiche Suppression des nicht adhäsiven Phänotyps einer *rim101Δ*-Mutation durch eine *cnb1Δ*-Mutation. Wie diese Suppression genau realisiert wird, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht bestimmt werden. Microarray-Analysen geben allerdings Hinweise darauf, dass in Gegenwart von *CRZ1* die *SMP1*-Expression positiv beeinflusst wird. Wahrscheinlich erfolgt eine Regulation der *SMP1*-Expression durch Crz1 indirekt, da bisher keine entsprechenden Transkriptionsfaktor-Bindestellen nachgewiesen werden konnten (Yoshimoto *et al.*, 2002). Nach den bisher beschriebenen Ergebnissen könnte also ein leichter Smp1-abhängiger Adhäsionsverlust durch eine basale Calcineurin-abhängig gesteuerte *SMP1*-

Expression induziert werden. So wäre auch zu erklären, dass eine *smp1Δ*-Mutation den Adhäsionsverlust einer *rim101Δ*-Mutation im  $\Sigma$ 1278b-Stammhintergrund an Polystyrol-Plastik um etwa 50 % supprimieren kann. Dieses Modell würde im SK-1-Stammhintergrund auch die völlige Suppression des Adhäsionsverlustes einer *rim101Δ*-Mutation durch eine *smp1Δ*-Mutation an Agar erklären (Lamb & Mitchell, 2003).

Eine *sfl1Δ*-Mutation kann den nicht adhäsiven Phänotyp einer *rim101Δ*-Deletionsmutation ebenfalls supprimieren. Wie könnte diese Art der Suppression erfolgen? Sfl1 ist als transkriptioneller Repressor der Flo11-abhängigen Flokkulation bekannt (Robertson *et al.*, 2000; Robertson & Fink, 1998) und wird durch die katalytische Untereinheit Tpk2 der Proteinkinase A des Ras2-/cAMP-Signalwegs inhibiert, die in Gegenwart von Glucose, Ammonium, Aminosäuren und Phosphat aktiv ist (Conlan & Tzamarias, 2001; Pan & Heitman, 2002). Eine Erklärung für die erfolgreiche Suppression ergibt sich daraus, dass in der *rim101Δ sfl1Δ*-Doppelmutante Nrg1 und Nrg2 einerseits an den *FLO11*-Promotor binden und ihn reprimieren können, da sie von der Rim101-Kontrolle entkoppelt sind, andererseits der Verlust des Sfl1 Repressors das Aktivierungsgleichgewicht des *FLO11*-Promotors positiv beeinflusst. So wird für den zu *FLO11* fast identischen *STAI*-Promotor (Gagiano *et al.*, 1999b; Lo & Dranginis, 1996) ein Modell beschrieben, in dem eine durch Sfl1 gebundene UAS-Bindestelle eine benachbarte UAS-Bindestelle derart blockiert, dass die *FLO11*-Aktivatoren Ste12 und Tec1 nicht binden können (Kim *et al.*, 2004). Dadurch, dass in der *rim101Δ sfl1Δ*-Doppelmutante die relevante UAS-Bindestelle für die beiden Aktivatoren Ste12 und Tec1 frei zugänglich ist, wirkt deren aktivierende Wirkung der Nrg1- und Nrg2-vermittelten Repression möglicherweise entgegen und beeinflusst die *FLO11*-Expression insgesamt positiv.

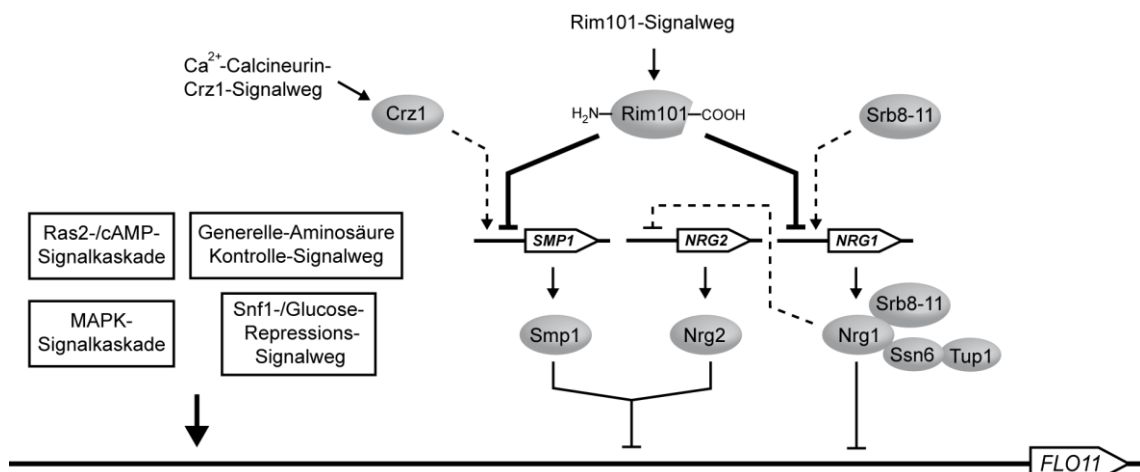
Der nicht adhäsive Phänotyp einer *rim101Δ*-Deletionsmutation wird auch durch eine *srb8Δ*- oder *srb10Δ*-Mutation erfolgreich supprimiert. Für die Analyse dieses Befundes ist es zunächst wichtig, die Funktion der untersuchten Komponenten darzustellen: Srb8, Srb9, Srb10 und Srb11 liegen zusammen in einem diskreten Komplex vor, der an der Repression zahlreicher Hefegene beteiligt ist (Carlson, 1997; Kim *et al.*, 2004). Srb10 und Srb11 sind Homologe der Cyclin-abhängigen Kinase (CDK) bzw. von Cyclin C und arbeiten als ein CDK/Cyclin-Dimer (Kuchin *et al.*, 1995; Liao *et al.*, 1995), das *in vitro* die C-terminale Domäne (CTD) der größten Untereinheit des RNA-Polymerase-II-Komplexes phosphorylieren kann (Hengartner *et al.*, 1998; Liao *et al.*, 1995) und von

der Hefe bis zum Menschen hoch konserviert ist (Borggreve *et al.*, 2002). Wird die CTD vor der Bildung des DNA-Polymerase-II-Komplexes phosphoryliert, führt dies zu einer konsequenten Inhibition der Zielgen-Transkription (Hengartner *et al.*, 1998). Die CTD kann in verschiedenen Phosphorylierungsstufen vorkommen und steuert zusammen mit dem Mediatorkomplex die Regulation der Transkriptionsinitiation, mit dem Elongatorkomplex die Chromatinmodifikation während der RNA-Ketten-Verlängerung und zusammen mit zahlreichen anderen Komplexen das Capping, Splicen, Schneiden und die Polyadenylierung (Corden & Patturajan, 1997; Lee *et al.*, 2000; Myers & Kornberg, 2000; Proudfoot *et al.*, 2002). Welche Rolle der Srb8-11-Komplex in Hinblick auf den RNA-Polymerase-II-Mediatorkomplex spielt, wird kontrovers diskutiert, da die vier Srbs nicht mit dem Mediatorkomplex kopräzipitiert werden konnten (Borggreve *et al.*, 2002). Deshalb wird er meist als separat assoziierter Komplex gesehen (Carlson, 1997). Es stellt sich die Frage, in welchem Zusammenhang Srb8 und Srb10 zur Regulation des haploid adhäsiven Wachstums stehen: Eine Deletion der Gene, die für die Srb8- und Srb10- Untereinheiten kodieren, führt zu einer konstitutiven Aktivierung des invasiven Wachstums in haploiden Hefezellen (Palecek *et al.*, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass der Srb8-11-Komplex einen positiven Effekt auf die Expression sowohl von *NRG1* als auch *SFL1* in Gegenwart von Glucose hat. Ob dies direkt oder indirekt geschieht, wurde bisher nicht festgestellt. Für Srb10-HA konnte keine Bindung an den *NRG1*- und *SFL1*-Promotor mittels ChIP bestätigt werden, was eine indirekte Regulation vermuten lässt. Durch pull-down Experimente wurde jedoch gezeigt, dass sowohl GST-Nrg1 als auch GST-Sfl1 mit Srb10-HA kopräzipitieren und so möglicherweise gemeinsam an der Zielgenrepression, wie im Falle des *STA1*-Promotors, der zu dem von *FLO11* fast identisch ist, beteiligt sind (Gagiano *et al.*, 1999b; Kim *et al.*, 2004; Lo & Dranginis, 1996). Eine Deletion von *SRB8* und *SRB10* hingegen stört die Bildung eines funktionellen Srb8-11-Komplexes und verhindert dadurch wahrscheinlich die Kopräzipitation mit Nrg1 und Sfl1, was letztlich eine erfolgreiche *FLO11*-Expression ermöglicht.

### **3.1.3 Modell der Rim101-abhängig regulierten *FLO11*-Expression unter aziden Bedingungen**

Wie erfolgt die Rim101-abhängige *FLO11*-Expression unter aziden Bedingungen im *S. cerevisiae*  $\Sigma$ 1278b-Stammhintergrund? In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass

unter vegetativen Wachstumsbedingungen die Expression der Transkriptionsrepressoren Nrg1 und Smp1 durch Rim101 reprimiert wird. Eine frühere Arbeit, die im SK1-Stammbhintergrund die Bindung von Rim101 an die Promotoren von *NRG1* und *SMP1* und die *RIM101*-abhängige Genexpression beider Repressoren nachwies, ergänzt dieses Ergebnis (Lamb & Mitchell, 2003). Neben Nrg1 und Smp1 wirkt Nrg2 ebenfalls reprimierend auf die *FLO11*-Expression. Die Expression von Nrg2 wird durch Rim101 im Gegensatz zu Nrg1 und Smp1 jedoch positiv beeinflusst. So nimmt die Nrg2-Menge in einer *rim101*-Deletionsmutante ab. Wie könnte eine positive Regulation von Nrg2 durch Rim101 erfolgen? Eine Analyse des *NRG2*-Promotors auf vorhandene TF-Bindestellen mittels <http://www.yeasttract.com> ergab -235 bis -231 bzw. -163 bis -160 stromaufwärts vom ATG-Startcodon ein Nrg1-BM II (revers) bzw. Nrg1-BM I. Wahrscheinlich erfolgt eine positive Beeinflussung der *NRG2*-Expression also durch eine Rim101 gesteuerte Repression von *NRG1*. Außerdem konnte bisher kein Rim101-Bindemotiv im Nrg2-Promotor nachgewiesen werden.



**Abbildung 48: Modell der Rim101-abhängig regulierten *FLO11*-Expression unter aziden Wachstumsbedingungen**

Unter aziden Umgebungsbedingungen wird die *NRG1*- und *SMP1*-Expression durch Rim101 reprimiert. Nrg1, Nrg2 und Smp1 wirken unter diesen Bedingungen nur schwach reprimierend auf die *FLO11*-Expression. Die Summe aller regulatorischen Einflüsse der den *FLO11*-Promotor kontrollierenden Signalwege führt insgesamt jedoch zu einer Aktivierung der *FLO11*-Expression. Die Linienstärke geht mit dem Maß der regulatorischen Stärke einher. Nähere Erläuterungen erfolgen im Text.

Unter vegetativen Wachstumsbedingungen unterliegt *SMP1* einer positiven Regulation durch den *Ca*<sup>2+</sup>-Calcineurin-Crz1-Signalweg. Dies geschieht wahrscheinlich indirekt über Crz1 (vgl. Kapitel 3.1.2) (Yoshimoto *et al.*, 2002). Der Srb8-11-Komplex unterstützt unter vegetativen Wachstumsbedingungen die *NRG1*-Expression zum einen indirekt, wird aber zum anderen wie der Ssn6-Tup1-Repressor-Komplex bei der Zielgenrepression durch Nrg1 rekrutiert, was für den zu *FLO11* sehr ähnlichen *STA1*-

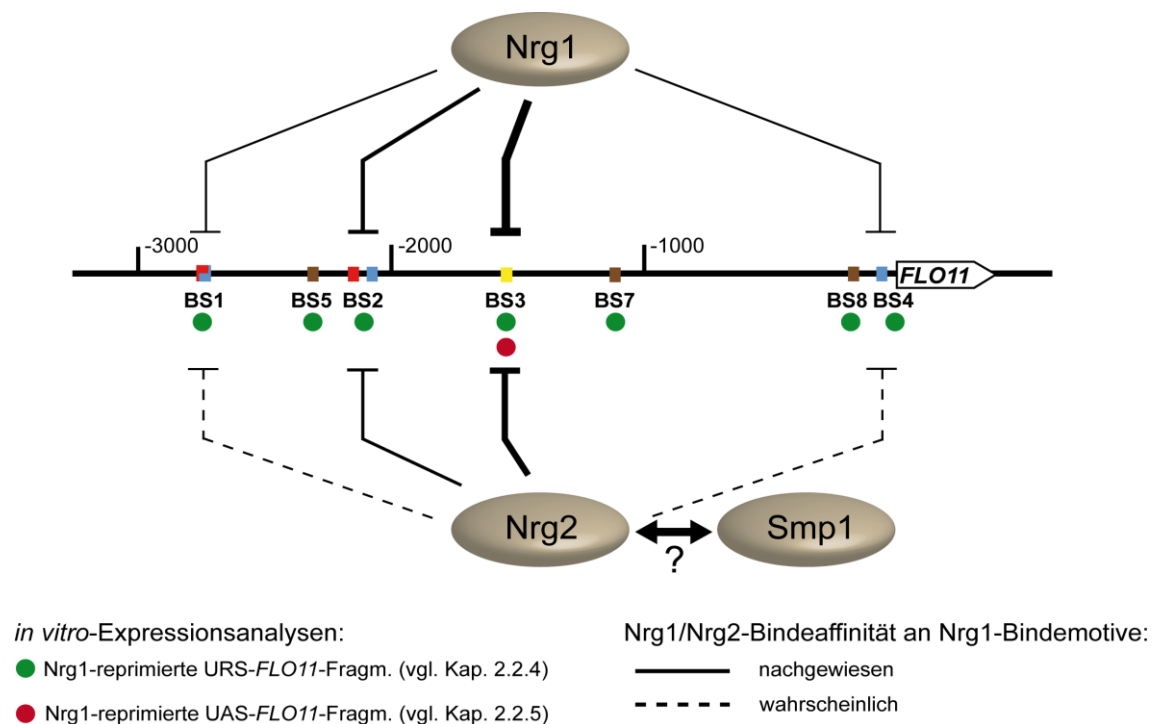
Promotor gezeigt werden konnte (vgl. Kapitel 3.1.2) (Gagiano *et al.*, 1999b; Kim *et al.*, 2004; Lo & Dranginis, 1996; Park *et al.*, 1999). Dieses Modell wird für den *FLO11*-Promotor durch die erfolgreiche Suppression des nicht adhäsiven Phänotyps einer *rim101Δ*-Mutation durch eine *srb8Δ*- als auch eine *srb10Δ*-Mutation unterstützt. Man geht davon aus, dass der Srb8-11- und Ssn6-Tup1-Komplex die Ausbildung einer repressiven Chromatin-Struktur über den Transkriptionsstart durch Interaktion mit Histonschwänzen und Histon-Deacetylasen induziert oder die Funktion der Transkriptionsmaschinerie durch direkte Interaktion mit spezifischen Komponenten des RNA-Polymerase-II-Holoenzym inhibiert wird (Kim *et al.*, 2004; Kuchin & Carlson, 1998; Park *et al.*, 1999). Die Summe aller regulatorischen Einflüsse der den *FLO11*-Promotor kontrollierenden Signalwege führt insgesamt jedoch zu einer Aktivierung der *FLO11*-Expression (Abbildung 48).

### 3.2 Regulation und Steuerung des *FLO11*-Promotors durch Nrg1 und Nrg2

Bisher war unklar, welche Bereiche im *FLO11*-Promotor die Repression von Nrg1 und Nrg2 vermitteln. Durch *in vitro*-Bindestudien, -Expressionsstudien und Adhäsionstests wurde dieser Sachverhalt näher untersucht.

Im Rahmen einer betreuten Diplomarbeit (Schäfer, 2009) konnte die Bindung von HIS-GST-Nrg1 an die Bindesequenzen *FLO11*-BS1, *FLO11*-BS2, *FLO11*-BS3 und *FLO11*-BS4 nachgewiesen werden, die allerdings unterschiedlich stark ausgeprägt war. Konkurrenzexperimente ergaben, dass die Bindeaffinität von HIS-GST-Nrg1 an *FLO11*-BS1 und *FLO11*-BS4 etwa 10-fach geringer als an *FLO11*-BS3 und etwa 5-fach geringer als an *FLO11*-BS2 war, das im Gegensatz zu *FLO11*-BS1 und *FLO11*-BS4 zwei Nrg1-Bindemotive trägt. Die Untersuchung eines Bereiches im *STAI*-Promotor aus *S. cerevisiae* var. *diastaticus*, dessen Sequenz der des Fragments *FLO11*-BS2 entspricht, ergab in Konkurrenzexperimenten mit GST-Nrg1 ebenfalls eine schwache Bindeaffinität des Transkriptionsrepressors zu diesem Bereich (Park *et al.*, 1999). Neben der Untersuchung der zuvor erwähnten *FLO11*-Sequenzen auf Nrg1-Bindung gelang die erstmalige Identifizierung von Nrg2-Bindemotiven. So konnte eine HIS-GST-Nrg2-Bindung an *FLO11*-BS2 und *FLO11*-BS3 gezeigt werden, wobei die für HIS-GST-Nrg2 in kompetitiven Bandshift-Experimenten ermittelten Bindeaffinitäten an

diese Bindesequenzen jeweils geringer als die von HIS-GST-Nrg1 waren. Dieses Ergebnis geht mit der Erkenntnis für die Transkriptionsfaktoren Mig1, Mig2 und Mig3 einher, die ähnliche Zinkfinger-DNA-Bindedomänen wie Nrg1 und Nrg2 enthalten und sich untereinander ebenfalls in ihren Bindeaffinitäten zu gleichen Sequenzmotiven unterscheiden (Lutfiyya *et al.*, 1998; Lutfiyya & Johnston, 1996). Die geringen Unterschiede der Aminosäuresequenzen der DNA-Bindedomänen sind wahrscheinlich für diese unterschiedlichen Bindeaffinitäten verantwortlich. Eine Überprüfung der Nrg2-Bindeaffinität an die Bindesequenzen *FLO11*-BS1 und *FLO11*-BS4 steht noch aus, wobei jedoch zu erwarten ist, dass sie gleichermaßen durch Nrg2 gebunden werden können. Diese Vermutung stützt sich auf die Tatsache, dass sich die *FLO11*-BS1 aus zwei Bindemotiven zusammensetzt (Nrg1-BM I & II), die auch in *FLO11*-BS2 vorkommen und durch HIS-GST-Nrg2 gebunden werden. *FLO11*-BS4 trägt das Bindemotiv Nrg1-BM I und sollte deshalb ebenfalls von Nrg2 gebunden werden (Abbildung 49).



**Abbildung 49: Modell der kooperativen Regulation von *FLO11* durch Nrg1 und Nrg2**

Die nachgewiesene Bindeaffinität von Nrg1 und Nrg2 an die einzelnen Nrg1-Bindesequenzen ist durch Linien dargestellt (fett = hoch, dünn = niedrig). Bindesequenzen, für die in *lacZ*-Reporter-Gen-Versuchen eine Nrg1-vermittelte Repression nachweisbar war, sind mit Punkten markiert. Nähere Erläuterungen erfolgen im Text.



Wie erfolgt die Regulation des *FLO11*-Promotors durch Nrg1 und Nrg2?

Die vorliegenden Resultate von *in vitro*-Expressionsstudien, die den gesamten *FLO11*-Promotor in Form von 200 bp bzw. 400 bp großen URS-Reporterplasmiden abdeckten, zeigten einen Bereich von -1600 bp bis -1900 bp stromaufwärts vom ATG, der in Abwesenheit von *RIM101* Repression vermittelt. Diese Repression wurde in einer *rim101Δ nrg1Δ*-Doppelmutante stärker als in einer *rim101Δ nrg2Δ smp1Δ*-Dreifachmutante unterdrückt. Dieser Befund geht mit den Ergebnissen der *FLO11*-Promotoranalyse einher, die im Bereich -1650 bp bis -1644 bp das Nrg1-BM III ergab und vermuten lässt, dass es sich hierbei um ein prominentes Nrg1-Bindemotiv im *FLO11*-Promotor handelt. Dieses Bindemotiv wird durch Nrg2 nicht nur gebunden, sondern ist auch funktionell. So wurde für diesen Promotorbereich in einer *rim101Δ nrg2Δ smp1Δ*-Dreifachmutante eine höhere  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität als in einem *rim101*-Deletionsstamm gemessen, wohingegen die Aktivität in einer *rim101Δ smp1Δ*-Doppelmutante etwa auf dem Niveau einer *rim101Δ*-Mutante lag. Zudem ist für diesen Bereich kein Smp1-Bindemotiv bekannt.

Eine Mutation des Nrg1-BM III (5'-GGACCCT-3') durch Austausch der für C2H2-Zinkfingerproteine kritischen Cytidin-Nukleotide gegen Thymidin-Nukleotide an Position 4 und 5 innerhalb dieses Bindemotivs im Promotor einer auf einem *CEN*-Plasmid kodierten *FLO11*-Kopie reichte allerdings nicht aus, eine Nrg1-/Nrg2-abhängige *FLO11*-Repression in einer *rim101Δ*-Mutante stark zu supprimieren. Dieser Stamm zeigte nur einen schwachen Adhäsionsphänotyp, der qualitativ allerdings stärker als in einem *rim101*-Deletionsstamm ausfiel, der eine zusätzliche *FLO11*-Kopie ohne entsprechende Promotormutation trug. Durch die zusätzliche Expression einer *FLO11*-Kopie unter Kontrolle eines *PGK1*-Promotors konnte der nicht adhäsive Phänotyp eines *rim101*-Deletionsstamms kompensiert werden und glich dem eines Wildtypstamms. Dieser Befund lässt insgesamt den Schluss zu, dass die Nrg1- und Nrg2-vermittelte *FLO11*-Repression kooperativ über mehrere Nrg1-Bindestellen und nicht allein über das zentrale Nrg1-BM III erfolgt (Abbildung 49).

Gezielte *lacZ*-Reportergergen-Versuche mit *FLO11*-Promotorfragmenten, die Bindemotive tragen, die nachweislich durch Nrg1 gebunden werden können (*FLO11*-BS1, -BS2, -BS3 und -BS4) (Harbison *et al.*, 2004; Park *et al.*, 1999) oder mögliche Nrg1-Minimalbindemotive enthalten (*FLO11*-BS5, -BS7 und -BS8; wobei

*FLO11*-BS6 ein größeres Nrg1-Bindemotiv repräsentiert) (Zhu *et al.*, 2009) und unter konstitutiver Aktivierung durch zwei UAS-Elemente exprimiert wurden, zeigten für alle getesteten *FLO11*-Promotorfragmente, mit Ausnahme von *FLO11*-BS6, eine deutliche Nrg1-abhängige Regulation (Abbildung 49).

Die Rim101-abhängige Repression weiterer Transkriptionsfaktoren, die reprimierend auf die zuvor angeführten *FLO11*-Promotorfragmente (mit Ausnahme von *FLO11*-BS6) einwirken, konnte durch die Bestimmung der jeweiligen  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in einer *rim101 nrg1*-Doppelmutante im Vergleich zu den Aktivitäten in einer *nrg1* $\Delta$ -Mutante bzw. *rim101* $\Delta$  *nrg1* $\Delta$ -Doppelmutante indirekt bestätigt werden. Hierbei könnte es sich möglicherweise um Nrg2 handeln, das nicht mehr mit Nrg1 um die gleichen Nrg1-Bindestellen konkurrieren muss. Unter den angelegten Versuchsbedingungen reichten bereits Nrg1-Minimalbindemotive für die Vermittlung einer Nrg1-abhängigen Repression aus, wie im Falle von *FLO11*-BS5 und -BS8 (5'AGGG-3'), sowie *FLO11*-BS7 (5'TGGG-3') bestätigt wurde. Das Motiv 5'-A/T-CCC-A/T-3' bzw. 5'-A/T-GGG-A/T-3' stellt sich hierbei als kritisch für eine Nrg1-abhängige Repression heraus und bestätigt das Kernbindemotiv der PWM für Nrg1-Bindestellen nach Zhu *et al.*, 2009.

Um eine Beeinflussung der URS- und UAS-Aktivitäten der getesteten *FLO11*-Fragmente auszuschließen, wurden sie ebenfalls unter UAS-freier Kontrolle untersucht. Das Fragment *FLO11*-BS3 vermittelte neben einer deutlichen UAS-Funktion, die einen oder mehrere unbekannte Aktivatoren rekrutiert, auch hier eine deutliche Nrg1-abhängige Regulation der Reportergenexpression (Abbildung 49). Eine Mutation dieses Bindemotivs zeigte für *FLO11*-BS3M eine Derepression der Reportergenexpression und einen Verlust der Bindeaffinität zu Nrg1. Bindestellen für mögliche Aktivatoren dieses *FLO11*-Fragments wurden unter Verwendung von <http://www.yeasttract.com> und <http://thebrain.bwh.harvard.edu/uniprobe> (Version 26. Juni, 2010) in einer bioinformatischen Analyse bestimmt, wobei Bindemotive für Stb5, Tec1, Cha4, Rgt1 und Hsf1 auf diesen Fragmenten nachgewiesen wurden. Während eine *FLO11*-Regulation durch Stb5, Cha4, Rgt1 und Hsf1 bisher nicht bekannt ist, wurde Tec1 als transkriptioneller Aktivator von *FLO11* bestätigt (Madhani & Fink, 1997). Für eine Tec1-Bindung scheint das innerhalb des DNA-Fragments *FLO11*-BS3(M) vorhandene Tec1-Bindemotiv jedoch nicht ausreichend zu sein (Heise *et al.*, 2010). Hsf1 (Heat Shock transcription Factor) (Sorger & Pelham, 1987) wird unter alkalischem pH sowie

Glucosemangel aktiviert (Burnie *et al.*, 2006; Hahn & Thiele, 2004) und wäre unter diesen Bedingungen ein direkter Antagonist von Nrg1.

Für *FLO11*-BS2 ließ sich unter UAS-freier Kontrolle eine leichte UAS-Funktion konstatieren. Die zweitstärkste Bindeaffinität von Nrg1 nach *FLO11*-BS3 an diese Bindesequenz hätte eine deutliche Nrg1- und Rim101-abhängige Regulation vermuten lassen, zumal eine 200 bp lange Sequenz des *STA1*-Promotors, die sich aus der *FLO11*-BS2 Sequenz mit zusätzlichen 75 bp stromauf- bzw. stromabwärts flankierenden Regionen zusammensetzte, eine Nrg1-abhängige Repression vermittelte (Kim *et al.*, 2004; Park *et al.*, 1999). Möglicherweise reichte die Länge der verwendeten flankierenden Regionen dieses Bindemotivs hier nicht für eine effiziente Rekrutierung zusätzlich benötigter Corepressoren durch Nrg1 aus. Eine weitere Möglichkeit ist, dass weitere Transkriptionsfaktoren rekrutiert werden, die mit der Nrg1-Bindung interferieren. Eine Analyse mit <http://www.yeasttract.com> ergab, dass neben den beiden Transkriptionsrepressoren Rph1 und Gis1 auch die beiden Transkriptionsaktivatoren der Generellen Stressantwort, Msn2 und Msn4, an das Nrg1-Bindemotiv 5'-CCCCT-3' binden können. Während Rph1, Gis1, Msn2 und Msn4 mit einer Regulation der *FLO11*-Expression in Verbindung gebracht werden konnten, wurde nur für Msn2 und Msn4 bereits bestätigt, dass viele Gene, die durch Msn2 und Msn4 aktiviert werden, einer Repression durch Nrg1 und Nrg2 unterliegen und an UAS-Elemente binden, die ebenfalls potentielle Nrg1-Bindestellen darstellen können (Causton *et al.*, 2001; Gasch *et al.*, 2000; Martinez-Pastor *et al.*, 1996; Vyas *et al.*, 2005). In Abwesenheit einer konstitutiven *FLO11*-Promotorfragmentexpression zeigte sich neben einer UAS-Funktion bei *FLO11*-BS1 bei den untersuchten Fragmenten *FLO11*-BS4, -BS5, -BS6, -BS7 und -BS8 keine UAS-Aktivität oder deutliche Regulation durch Nrg1.

Insgesamt kristallisiert sich ein Modell heraus, in dem eine hohe *in vitro*-Bindeaffinität mit der *in vitro*-Regulation der Genexpression in *lacZ*-Reporter-gen-Versuchen korreliert, was für Nrg1-BS3 im Vergleich zu den weiteren untersuchten Bindestellen durch Bandshift-Experimente wie auch Expressionsanalysen von einzelnen DNA-Fragmenten und eine Gesamtpromotoranalyse bestätigt wird. Eine ähnliche Beobachtung konnte für die Transkriptionsfaktoren Mig1 und Mig2 gemacht werden, bei denen Bindestellen mit hoher Affinität zu einer stärkeren Repression eines *lacZ*-Reportergens führen als Bindestellen geringerer Affinität (Lutfiyya *et al.*, 1998).

Offen bleibt die Frage, wie Smp1 seine Repressorfunktion auf den *FLO11*-Promotor ausübt, da bisher keine der bekannten Smp1-Bindestellen, 5'-ACTACTA(A/T)4TAG-3' (Dodou & Treisman, 1997) und PWM von Zhu *et al.*, 2009, im *FLO11*-Promotor nachweisbar sind. Möglicherweise findet eine Interaktion der beiden Transkriptionsrepressoren Nrg2 und Smp1 statt, die so kooperativ in einem Repressorkomplex die Expression von *FLO11* gemeinsam über bekannte Nrg1-Bindemotive reprimieren (Abbildung 49). Diese Vermutung wird durch Agaradhäsionsassays genährt, in denen eine *rim101Δ*-Mutation im  $\Sigma$ 1278b-Stammhintergrund durch eine *nrg2Δ smp1Δ*-Doppelmutation, nicht aber eine *nrg2Δ*-Mutation supprimiert wird und einen adhäsiven Phänotyp zeigt. Um diese These zu untermauern, wäre es zunächst interessant, z. B. in einem zukünftigen *lacZ*-Reportergen-Versuch für den prominenten *FLO11*-Promotorbereich -1600 bp bis -1900 bp die Analyse um eine *rim101Δ nrg2Δ*-Doppelmutante zu erweitern. Hierdurch könnte sich ergeben, dass eine *rim101Δ nrg2Δ smp1Δ*-Dreifachmutante eine höhere  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität als eine *rim101Δ nrg2Δ*-Doppelmutante aufweist, wodurch sich indirekt ein synergistischer Repressions-Effekt von Nrg2 und Smp1 auf den gleichen Promotorbereich ableiten ließe.

### 3.3 Globale Veränderungen der Genexpression durch alkalischen pH

Die in dieser Arbeit durchgeführte Transkriptomanalyse gewährt erstmalig einen Einblick in die pH-abhängig regulierte Genexpression im *S. cerevisiae*  $\Sigma$ 1278b-Stammhintergrund. Während im Vergleich der Bedingungen pH 4,5 und pH 7 nur 67 der 5845 in dieser Microarray-Analyse berücksichtigten Gene differentiell exprimiert wurden, was etwa 1,5 % aller Gene entspricht, wurde durch alkalische pH-Bedingungen eine drastische Veränderung der Genexpression induziert. Vergleiche der unter pH 4,5 und pH 7 erhobenen Expressionsdatensätze mit dem unter pH 8 im Wildtypstamm erhobenen Datensatz zeigten eine veränderte Expression von etwa 13 % aller Gene.

Wie ist eine solch starke Transkriptomumschichtung unter alkalischen Umgebungsbedingungen zu erklären?

Unter alkalischen Bedingungen stellen Hefezellen des *S. cerevisiae* W303-Stammhintergrunds ihre Proliferation zeitnah in der G1-Phase des logarithmischen

Wachstums ein, was mit einer drastischen Abnahme der Expression der G1-Cycline (*CLN1* und *CLN2*) einhergeht (Hayashi *et al.*, 1998). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte auch für den *S. cerevisiae*  $\Sigma$ 1278b-Stammhintergrund eine Stagnation der Zellproliferation nach dem Austausch von azidem bzw. neutralem gegen alkalisch gepuffertes Medium durch die OD<sub>600</sub> bestimmt werden. Die Zellen befanden sich ebenfalls in einer stationären Phase. Diese Zellkultur-Phase gibt jedoch zunächst nur Aufschluss über den Status einer Kultur und lässt keine Aussage darüber zu, in welcher Zellzyklusphase die Hefezellen arretieren oder ob die Zellen in den Status der G0-Phase, also einen absoluten Ruhe- und Überdauerungszustand eintreten. Die G0-Phase wird für gewöhnlich als Zellzustand beschrieben, der nach dem Zellwachstum bis zur absoluten Sättigung in Vollmedium erreicht wird (Gray *et al.*, 2004). Bis zu diesem Status durchlaufen die Zellen verschiedene metabolische Prozesse, wie die Fermentation, die nicht fermentierbare Kohlenstoffprodukte, insbesondere Ethanol hervorbringt. Nach dem exponentiellen Wachstum und Aufbrauchen der verfügbaren Glucose reduzieren die Zellen ihr rapides Wachstum und stellen ihren Metabolismus für die Verwendung nicht fermentierbarer Kohlenstoffquellen um. Nach dem diauxischen Shift und dem Aufbrauchen aller nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen stellen die Zellen ihre Proliferation völlig ein (Lillie & Pringle, 1980). Die Zellen befinden sich dann in der stationären Phase, wobei die meisten Zellen einen absoluten Ruhezustand (G0-Arrest) erreicht haben (Werner-Washburne *et al.*, 1993). Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Resultate entsprechen nicht der klassischen Definition des G0-Arrests. So kann nach dreistündiger Inkubation einerseits ein Erreichen des diauxischen Shifts ausgeschlossen werden, andererseits proliferieren die Hefezellen unter alkalischen pH-Bedingungen nicht mehr, sondern arretieren zeitnah ihren Zellzyklus. Die Scan-Elektronenmikroskopie-Aufnahmen geben hier einen qualitativen Eindruck und zeigen sowohl juvenile als auch adulte Hefezellen, die einzellig als auch gesprosst vorliegen. G0-Zellen hingegen nehmen nicht mehr an Masse und Volumen zu und arretieren für gewöhnlich als ungesprossene Zellen (Pringle & Hartwell, 1981). Wenn die Definition des Eintritts in die G0-Phase weniger konservativ erfolgt, gibt es weitere Bedingungen, wie den Mangel an Stickstoff, Schwefel und Phosphat oder den unmittelbaren Kontakt von Hefezellen mit Wasser, die einen stabilen nicht proliferierenden Zellstatus hervorrufen (Thevelein *et al.*, 2000).

Alkalischer pH scheint bei den Hefezellen einen Zellzustand „in between“ zu induzieren: Einerseits treten die Hefezellen in die stationäre Phase ein ohne einen G0-Arrest zu erreichen, andererseits bedeutet die Alkalisierung der Umgebung eine Stress-Situation für die Zellen (Serrano *et al.*, 2006) und induziert zahlreiche zelluläre Antworten. Ein Vergleich der unter pH 4,5 und pH 7 mit den unter pH 8-Bedingungen gewonnenen WT-Expressionsdatensätze zeichnet hier ein deutliches Bild: unter pH 8 ist im Vergleich zu pH 4,5 und pH 7 die Expression von 67 % bzw. 74 % der differentiell exprimierten Gene erhöht. In der gemeinsamen Schnittmenge beider Vergleiche konnten für Gene mit erhöhter differentieller Genexpression die funktionellen Kategorien Transkription (Kontrolle; Repression), DNA-Prozessierung (Reparatur), Zellzyklus (Meiose) und Entwicklung von Ascosporen neben eher allgemeinen Kategorien wie Proteinbindung, Transport (intra-Golgi) und Genereller Metabolismus (Phosphat) annotiert werden. Wie kann die Anreicherung gerade dieser funktionellen Kategorien erklärt werden?

Es ist bekannt, dass extrazelluläre Veränderungen der Protonenkonzentration im pH-Bereich pH 3,0-7,5 den intrazellulären pH wenig beeinflussen, der etwa stabil bei pH 7,2 liegt (Orij *et al.*, 2009). Der intrazelluläre pH ist insbesondere für die Aktivität zahlreicher Enzyme mit einem pH-Optimum im physiologischen pH-Bereich und die Konduktivität von Ionenkanälen in eukaryotischen Zellen wichtig (Madshus, 1988). So führt eine Veränderung des externen pH auf 8,0, der somit höher als der interne pH von 7,2 liegt, zu einem reduzierten Wachstum und einem Anstieg des intrazellulären pH-Werts auf pH 7,5 (Orij *et al.*, 2009). Unter diesen Bedingungen nimmt die Syntheserate von DNA und RNA in eukaryotischen Zellen mit zunehmendem intrazellulären pH innerhalb des physiologischen Bereichs zu. Das Optimum der DNA-Polymerase liegt dabei generell sehr hoch und erhöht sich mit der Veränderung des pH von 7,0 nach 8,0 sogar außerhalb des normalen physiologischen Milieus (Madshus, 1988). Die erhöhte differentielle Expression von Genen aus den funktionellen Kategorien Meiose und Entwicklung von Ascosporen scheint für haploide Hefezellen zunächst überraschend, ist aber wahrscheinlich als weitere Antwort der Zellen auf ungünstige Umgebungsbedingungen zu interpretieren, die nach dem Erreichen der stationären Phase ihren Überdauerungszustand vorbereiten. Das Meiose-Programm kann hingegen nur in diploiden Zellen, erst nach Aufbrauchen von Glucose und in Gegenwart nicht fermentierbarer Kohlenstoffquellen wie Ethanol oder Acetat initiiert werden, wobei der

Meiose-Eintritt unter alkalischen Bedingungen auch in Gegenwart stickstoffreichen Mediums möglich ist (Hayashi *et al.*, 1998; Honigberg & Purnapatre, 2003).

Die Untersuchung der Vergleiche WT pH 4,5 - WT pH 8 und WT pH 7 - WT pH 8 ergab insbesondere eine Anreicherung für Gene aus den Bereichen Protein-Modifikation, -faltung und -stabilisation bzw. Homeostasis (Protonen), Transport (Kationen), Metabolismus (AS), Anabolismus (Nukleoside), Stress-Antwort (ungefaltete Proteine) und Energiebereitstellung (Citratzyklus). Hierbei handelt es sich überwiegend um Energie-Ressourcen verbrauchende oder energieaufwendige Prozesse. Möglicherweise führt unter alkalischen Stressbedingungen eine reduzierte Expression von Genen aus diesen Bereichen zu einer für die Zelle positiven Energiebilanz, insofern, dass freiwerdende Ressourcen für die priorisierte Expression dringend benötigter Gene für den Eintritt in die stationäre Phase oder den Eintritt in den Überdauerungszustand zur Verfügung stehen.

Die Analyse auf signifikant angereicherte TF-Bindestellen unterstützt die zuvor beschriebenen Ergebnisse, insbesondere den Eintritt in die stationäre Phase, in der Hinsicht, dass die assoziierten Transkriptionsfaktoren den Zellzyklus kontrollieren. So wurden im Vergleich WT pH 4,5 - WT pH 8 Gene mit reduzierter Genexpression angereichert, die Bindestellen für Transkriptionsfaktoren tragen, die beim Zellzyklusdurchlauf von Bedeutung sind (Fkh2), den Übergang durch die S-, G2- und M-Phase regulieren (Fkh1), in einem gemeinsamen Komplex den G1-/S-Phase-Übergang steuern (Mbp1 und Swi6) oder in der S-Phase exprimiert werden und an der Kernteilung (Ndd1) beteiligt sind:

Die Transkriptionsfaktoren Fkh1 (Forkhead (*Drosophila*) homolog1) und Fkh2 gehören zur Gruppe der Forkhead-Box-Proteine, die sich im Lauf der Evolution kaum verändert hat und in zahlreichen Wirbeltieren vorkommt. Die Forkhead-DNA-Bindedomäne ist eine hoch konservierte 110-AS-DNA-Binderegion (Durocher *et al.*, 1999), die nach dem *Drosophila* forkhead Protein benannt ist, das für die korrekte Ausbildung der terminalen Struktur von *Drosophila* Embryos benötigt wird (Weigel *et al.*, 1989). Fkh1 und Fkh2 regulieren die Transkription von *CLB2* und weiteren an der Mitose beteiligten Genen, die wiederum Antagonisten des filamentösen Wachstums sind (Zhu *et al.*, 2000). Das Cyclin Clb2 ermöglicht den G2- zu M-Phase-Übergang durch Aktivierung der Cyclin-abhängigen Kinase Cdc28 und wird hauptsächlich in der späten S-Phase

exprimiert (Mendenhall & Hodge, 1998; Surana *et al.*, 1991). Während Fkh1 und Fkh2 beim Pseudohyphenwachstum eine redundante Funktion innehaben, ist ihre Funktion beim Silencing und der Zellzyklusregulation antagonistisch. Eine Deletion von *FKH1* beschleunigt den Übergang durch die S-/G2-/M-Phase des Zellzyklus und resultiert im Vergleich zum Wildtyp in einer erhöhten Menge an *CLB2*-RNA, wohingegen eine Deletion von *FKH2* sowohl den Durchlauf des Zellzyklus verlangsamt als auch die Menge an *CLB2*-RNA reduziert (Hollenhorst *et al.*, 2000). Fkh1 und Fkh2 sind außerdem an der Filamentbildung und dem invasiven Wachstum beteiligt. Eine Deletion von *FKH1* und *FKH2* induziert das filamentöse Wachstum, wobei die Deletion von nur einem der beiden Transkriptionsfaktoren keinen Effekt zeigt (Hollenhorst *et al.*, 2000).

Mbp1 ist ein DNA-Bindeprotein, das zusammen mit Swi6 den MBF-Komplex (Mlu1 Cell Cycle Box [MCB] Binding Factor) bildet. MBF ist ein sequenzspezifischer Transkriptionsfaktor, der an die Konsensussequenz 5'-ACGCGT-3' bindet (Spellman *et al.*, 1998; Wolfsberg *et al.*, 1999) und die Gen-Expression während des G1-/S-Phase-Zellzyklus-Übergangs reguliert (Bähler, 2005; Breeden, 1996; Koch *et al.*, 1993; Koch & Nasmyth, 1994). Mehrere MBF regulierte Gene sind unter anderem in der DNA-Synthese und -Reparatur involviert (Bean *et al.*, 2005; Koch *et al.*, 1993; Lowndes *et al.*, 1991; McIntosh *et al.*, 1991). Mbp1 kann direkt, ohne Swi6, an DNA binden. Swi6 besitzt diese Fähigkeit nicht, ist aber als MBF-Transaktivator bekannt (Dirick *et al.*, 1992; Koch *et al.*, 1993; Lowndes *et al.*, 1992). Eine Deletion von *MBP1* führt zu einer Deregulation an der DNA-Synthese beteiligter Gene (Bean *et al.*, 2005).

Ndd1 (Nuclear Division Defective) ist ein essentieller Transkriptionsaktivator, dessen Expression während des Zellzyklus streng reguliert wird, wobei er hauptsächlich in der S-Phase exprimiert wird. Man geht davon aus, dass Ndd1 bei der Kernteilung involviert ist, da Zellen ohne *NDD1* mit einer verlängerten Knospe arretieren und neben einer kurzen mitotischen Spindel auch einen 2N DNA-Gehalt aufweisen, der Zellkern aber nicht geteilt ist. Ndd1 ist für die Expression des ebenfalls von Fkh1 und Fkh2 regulierten *CLB2* essentiell (Loy *et al.*, 1999). Ndd1 assoziiert mit dem *CLB2*-Promotor in ChIP-Analysen (Koranda *et al.*, 2000), wobei diese Rekrutierung sowohl Fkh1- und Fkh2-abhängig erfolgt (Sun *et al.*, 2002).

Ein weiterer Beleg für eine durch alkalische Bedingungen induzierte Stress-Antwort könnte die Anreicherung einer *RPN4*-Bindestelle für Gene mit erniedrigter



Genexpression im Vergleich *WT* pH 4,5 - *WT* pH 8 sein. Rpn4 (Regulatory Particle Non-ATPase) ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression zahlreicher Proteasom-Gene stimuliert und durch verschiedene Stress-Antworten reguliert wird. Die Rpn4 Level werden in einem negativen feedback-loop durch das 26S-Proteasom kontrolliert (Mannhaupt *et al.*, 1999; Xie & Varshavsky, 2001).

Welchen Einfluss hat die Abwesenheit von *RIM101* auf die globale Genexpression unter neutralen und alkalischen Bedingungen?

Die Vergleiche *WT* pH 7 - *WT* pH 8 und *rim101Δ* pH 7 - *rim101Δ* pH 8 haben eine Schnittmenge von weniger als 50 % gemeinsam regulierter Gene. Dabei zeigten 74 % der 761 Gene im Vergleich *WT* pH 7 - *WT* pH 8 bzw. 79 % der 920 Gene im Vergleich *WT* pH 7 - *WT* pH 8 und *rim101Δ* pH 7 - *rim101Δ* pH 8 eine erhöhte Genexpression. In Abwesenheit von *RIM101* sind also im Vergleich zum Wildtypstamm nicht nur 17 % mehr Gene differentiell exprimiert, es wurden auch mehr funktionelle Kategorien annotiert. Während insbesondere Gene aus den Kategorien DNA-Reparatur/-Transkription und Zellzyklus (Arrest; Meiose) eine erhöhte Expression aufwiesen, wurden Gene aus vielen energieaufwendigen oder Energie-Ressourcen verbrauchenden Bereichen (u. a. Transport, Metabolismus und Energie-Bereitstellung) reduziert exprimiert. Diese Regulationsmuster deuten vor allem auf eine besondere Funktion des Transkriptionsfaktors Rim101 bei der Aufrechterhaltung des Expressionsgleichgewichts unter alkalischen Stress-Bedingungen hin. So wird er nicht nur für die Anpassung an alkalische Bedingungen benötigt (Lamb *et al.*, 2001), sondern ist in diploiden Zellen auch für den Eintritt in die Meiose durch die Kontrolle der *IME1* (Initiator of Meiosis) Transkription von besonderer Bedeutung (Su & Mitchell, 1993b). Ime1 ist ein Hauptregulator der Meiose und aktiviert als Transkriptionsfaktor die Transkription früher meiotischer Gene. Zusammen mit der Serin-Threonin-Kinase Ime2 stößt er die Initiation der Meiose an (Mitchell, 1994), wobei die Expression beider Gene in Abhängigkeit voneinander reguliert wird (Honigberg & Purnapatre, 2003).

Weitere Hinweise auf eine besondere Rolle von Rim101 für die Aufrechterhaltung des Expressionsgleichgewichts unter alkalischen Stress-Bedingungen ergeben sich indirekt durch die Anreicherung von Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren Cbf1 und Hap2 im Vergleich *rim101Δ* pH 7 - *rim101Δ* pH 8 für Gene mit reduzierter Genexpression. Cbf1 (Centromer-Binding Factor) ist ein Transkriptionsfaktor mit besonderer

Bedeutung für die Chromosomensegregation. Es handelt sich hierbei um ein Helix-Loop-Helix-Protein, das an das Motiv '5-CACRTG-3' (R = A oder G) bindet. Dieses Bindemotiv kommt sowohl in *MET*-Genen als auch im Centromer-DNA-Element 1 (CDE1) vor (Kent *et al.*, 2004; Niedenthal *et al.*, 1991). Die Deletion von *CBF1* führt zu einem erhöhten Chromosomenverlust, einer Methionin-Auxothrophie und einer Hypersensitivität gegenüber Microtubuli störende Chemikalien (Foreman & Davis, 1993). In *C. albicans* hingegen wird der Centromer-Bindefaktor CaCbf1 nicht für eine korrekte Chromosomen-Segregation benötigt (Biswas *et al.*, 2003).

Hap2 ist eine Komponente eines Transkriptionsfaktorkomplexes, der die Expression von Genen als Antwort auf das Wachstum auf nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen induziert. Hap2 bildet dabei die Untereinheit eines heteromeren Transkriptionsfaktorkomplexes, der sich aus den Untereinheiten Hap2, Hap3, Hap4 und Hap5 zusammensetzt (Forsburg & Guarente, 1989; Hahn *et al.*, 1988; McNabb *et al.*, 1995; Pinkham & Guarente, 1985). Dieser Komplex bindet in Promotoren an das Motiv '5-CCAAT-3' und aktiviert so die Transkription von Genen als Antwort auf das Wachstum unter nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen (Xing *et al.*, 1993). Die Untereinheiten Hap2 und Hap3 binden u. a. zusammen mit dem Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Mig1 in Gegenwart von Glucose an eine UAS2 im *CYC1* (Iso-1-Cytochrom C)-Promotor und inhibieren diesen (Hahn & Guarente, 1988; Olesen *et al.*, 1987; Treitel & Carlson, 1995). Bei *Cyc1* handelt es sich um einen Elektronenüberträger aus der Familie der Cytochrome, der in den Mitochondrien als Elektronenüberträger bei der oxidativen Phosphorylierung eine entscheidende Rolle während der zellulären Respiration spielt.

Zusammenfassend ergibt sich ein Bild, in dem alkalischer pH extreme Stressbedingung hervorruft, durch die eine deutliche Umschichtung des Transkriptoms im Vergleich zu aziden bzw. neutralen Umgebungsbedingungen stattfindet. Unter alkalischen Bedingungen scheinen insbesondere Bereiche mit kritischer Funktion für die Zellintegrität priorisiert reguliert zu werden, wobei die Zellen sich im Zustand der stationären Phase für einen Überdauerungszustand vorzubereiten scheinen, was durch die Anreicherung vieler Zellzyklus-assoziiierter TF-Bindestellen unterstrichen werden könnte. Rim101 nimmt dabei unter alkalischen Umgebungsbedingungen eine bisher wenig realisierte, aber anscheinend wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des Transkriptomgleichgewichts ein.

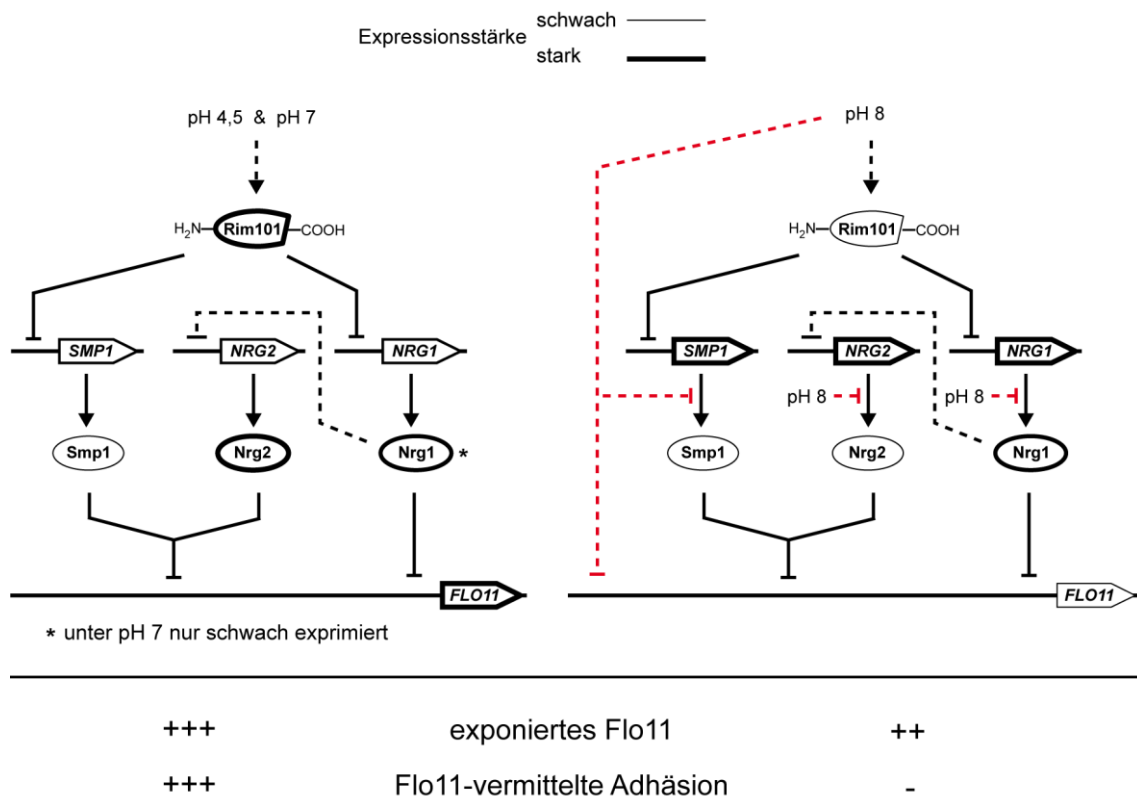
### 3.4 Regulation des Rim101-Signalwegs und der *FLO11*-Expression durch pH

Eine wichtige Erkenntnis aus dieser Arbeit ist der Befund, dass der Rim101-Signalweg im  $\Sigma 1278b$ -Stammhintergrund für das adhäsive Wachstum essentiell, aber nicht über den gesamten pH-Bereich wirksam ist. Durch epistatische Analysen wurde sowohl für azide als auch neutrale pH-Bedingungen bestätigt, dass der Adhäsionsverlust einer *rim101*-Deletionsmutation an Polystyrol-Plastik nicht nur durch eine *nrg1* $\Delta$ -Mutation, sondern auch eine *nrg2* $\Delta$  *smp1* $\Delta$ -Doppelmutation supprimiert werden kann. Im Gegensatz dazu steht der extreme Adhäsionsverlust der Zellen an Polystyrol-Plastik unter alkalischen Bedingungen, der weder in einer der getesteten TF-Deletionsmutanten supprimiert werden konnte, noch durch eine Entkopplung der *FLO11*-Expression durch den alternativen *PGK1*-Promotor kompensiert werden konnte.

Wodurch wird ein solch drastischer Adhäsionsverlust unter alkalischen Bedingungen hervorgerufen?

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass der Adhäsionsverlust einerseits Rim101-Signalweg-unabhängig erfolgt, andererseits durch alkalische Umgebungsbedingungen hervorgerufen wird (Abbildung 50). Die relative *RIM101*-Genexpression war zwar unter alkalischen pH-Bedingungen im Vergleich zu aziden und neutralen pH-Bedingungen stark erhöht, resultierte aber in einer reduzierten Menge Rim101. So konnte unter alkalischen Bedingungen eine etwa 50-fache bzw. 35-fache Abnahme der Menge an prozessiertem und unprozessiertem Rim101 im Vergleich zu aziden bzw. neutralen Bedingungen bestimmt werden. Dieses Resultat könnte die erhöhte relative *NRG1*- und *SMP1*- Genexpression in alkalischem Milieu erklären, insbesondere weil *NRG1* und *SMP1* direkt über ihre Promotoren durch Rim101 reprimiert werden (Lamb & Mitchell, 2003). Für die ebenfalls erhöhte *NRG2*-Genexpression, die im Gegensatz zur *NRG1*- und *SMP1*-Genexpression in Gegenwart von *RIM101* positiv beeinflusst wird, greift diese Erklärung hingegen nicht. Da bisher keine entsprechenden Bindestellen im *NRG2*-Promotor identifiziert werden konnten, erfolgt diese Regulation wahrscheinlich indirekt über Rim101. Insgesamt resultiert eine erhöhte *NRG1*-, *NRG2*-, und *SMP1*-Genexpression unter pH 8 jedoch nicht in einer ebenso stark erhöhten Proteinmenge der drei Transkriptionsfaktoren. Die Menge an Nrg1 unter pH 8 entsprach etwa dem unter pH 4,5 bestimmten Niveau, die Menge an Nrg2 war in alkalischem

Milieu im Vergleich zu pH 4,5 und pH 7 extrem reduziert und konnte für Smp1 unter aziden, neutralen und basischen Umgebungsbedingungen kaum bestimmt werden. Die Menge an Nrg1, Nrg2 und Smp1 war unter alkalischen im Vergleich zu aziden und neutralen Bedingungen im Wildtypstamm effektiv nicht erhöht. Es ist also davon auszugehen, dass die stark reduzierte *FLO11*-Genexpression unter alkalischen Bedingungen nicht in kausalem Zusammenhang mit einer *FLO11*-Repression durch Nrg1, Nrg2 bzw. Smp1 steht, sondern unabhängig vom Rim101-Signalweg durch bisher nicht identifizierte Faktoren vermittelt wird.



**Abbildung 50: Die pH-abhängige Regulation des adhäsiven Wachstums erfolgt sowohl in Abhängigkeit als auch unabhängig vom Rim101-Signalweg.**

Unter aziden und neutralen Umgebungsbedingungen ist der Rim101-Signalweg für die Regulation und Aufrechterhaltung der Adhäsion essentiell. Unter alkalischen Bedingungen verliert der Rim101-Signalweg seine regulatorische Funktion. Während die Menge an Nrg1, Nrg2 und Smp1 unter pH 8 im Vergleich zu pH 4,5 und pH 7 nicht erhöht ist, wird die *FLO11*-Expression drastisch reduziert. Die Beeinflussung der *FLO11*-Expression erfolgt pH-abhängig, aber unabhängig vom Rim101-Signalweg durch bisher unbekannte Mechanismen. Die stark reduzierte *FLO11*-Expression geht allerdings nicht mit einer ebenso starken Flo11-Abnahme an der Oberfläche einher. Die Adhäsionseigenschaften der Zelle sind unter pH 8-Bedingungen jedoch völlig reduziert, was auf eine direkte Beeinflussung von Flo11 oder der gesamten Zelloberfläche durch alkalisches Milieu hindeutet. Weitere Erläuterungen im Text.

Die unter alkalischen Bedingungen im Vergleich zu pH 4,5 und pH 7 stark reduzierte relative *FLO11*-Genexpression ist jedoch nicht als der ausschlaggebende Grund für den Adhäsionsverlust an Polystyrol-Plastik anzusehen. So ergab die FACS-Analyse unter pH 8-Bedingungen im Vergleich zu pH 4,5 auch nur eine um 25 % reduzierte

Exposition von Flo11 an der Zelloberfläche. Dass sich diese moderate Flo11-Reduktion für eine um 80 % reduzierte Zelladhäsion verantwortlich zeichnet, ist eher unwahrscheinlich. Außer einer veränderten *FLO11*-Genexpression scheinen vielmehr die Eigenschaften des Proteins an der Zelloberfläche bzw. die Zelloberfläche selbst durch alkalischen pH beeinflusst zu werden, worauf im folgenden Kapitel näher eingegangen wird.

Im Reich der Pilze ist der Rim101-/PacC-Signalweg sowohl in Asco- als auch Basidiomyceten hoch konserviert und für die Anpassung an einen weiten pH-Bereich von Bedeutung (Peñalva & Arst, 2004; Peñalva & Arst, 2002; Peñalva *et al.*, 2008). Die vorliegenden Resultate ergänzen dieses Bild insofern, als sich die regulatorische Funktion des Rim101-Signalwegs trotz hoher Konservierung sogar innerhalb einer Art, wie im Hefepilz *S. cerevisiae* unterscheiden kann und daher differenzierter zu betrachten ist.

Während in der vorliegenden Arbeit für den *S. cerevisiae*  $\Sigma 1278b$ -Stammhintergrund vor allem die Bedeutung des Rim101-Signalwegs für das adhäsive Wachstum unter aziden und neutralen Bedingungen dargestellt werden konnte, unterscheiden sich die gewonnenen Ergebnisse teilweise deutlich von denen, die für den *S. cerevisiae* SK1-Stammhintergrund bekannt sind. Hier ist insbesondere die unterschiedliche Expression und Prozessierung des zentralen Transkriptionsrepressors Rim101 hervorzuheben. So ist die Rim101-Expression und -Prozessierung im  $\Sigma 1278b$ -Stammhintergrund unter pH 4,5 und pH 7 ähnlich hoch, wobei die unprozessierte Form überwiegt. Unter pH 8 nimmt die Rim101-Expression dagegen drastisch ab. Diese Resultate konnten in der vorliegenden Arbeit ebenfalls für den S288c-Stammhintergrund bestätigt werden und unterscheiden sich von den Erkenntnissen im SK1-Stammhintergrund, in dem Rim101 unter pH 6 überwiegend in seiner prozessierten Form vorliegt, zumal die Menge an prozessiertem Rim101 unter pH 8 weiter zunimmt (Li & Mitchell, 1997). Aber nicht nur die Rim101-Prozessierung, auch das Wachstum unter alkalischen pH-Bedingungen unterscheidet sich in beiden Stammhintergründen. Während Hefezellen des  $\Sigma 1278b$ -Stammhintergrunds unter alkalischen pH-Bedingungen in die stationäre Phase eintreten, kann für Hefezellen des SK1-Stammhintergrundes schwaches Wachstum auf Agar sogar unter pH 9-Bedingungen nachgewiesen werden (Lamb & Mitchell, 2003). Zwar konnte für den *S. cerevisiae* SK1-Stammhintergrund kein Rim101-Nrg1-abhängig reguliertes adhäsives Wachstum bestätigt werden (eine *rim101 $\Delta$  nrg1 $\Delta$* -Doppelmutante

weist in diesem Stammhintergrund im Gegensatz zum  $\Sigma 1278b$  einen nicht adhäsiven Phänotyp auf), dennoch erfolgt auch hier eine Rim101-Nrg1-abhängige Regulation, die das Wachstum unter alkalischem pH, hohen Salz-Konzentrationen und in Gegenwart von LiCl ermöglicht. So reguliert Rim101 unter alkalischem pH indirekt, durch die Repression von *NRG1*, die Expression von *ENA1*, das für eine  $\text{Na}^+$ -Efflux-Pumpe kodiert (Lamb & Mitchell, 2003; Lamb *et al.*, 2001).

Während in *S. cerevisiae* Rim101 und Nrg1 also in einem Signalweg in Abhängigkeit voneinander arbeiten, unterscheidet sich dieses Bild von dem in der humanpathogenen Hefe *C. albicans*. Hier reguliert CaRim101 unabhängig von CaNrg1 die Expression der  $\text{Na}^+$ -ATPase CaEna2, die für das Wachstum in alkalischen und LiCl-Umgebungen benötigt wird (Bensen *et al.*, 2004). Neben der regulatorischen Funktion bei der Anpassung an neutralen und alkalischen pH ist der CaRim101-Signalweg aber vor allem auch für die Pathogenität durch Regulation des pH-induzierten Dimorphismus verantwortlich (Davis, 2009). Während der Pilz unter aziden pH-Bedingungen in der Hefezellform wächst, überwiegt unter alkalischen Bedingungen die hyphale Wachstumsform (Davis, 2003; Konno *et al.*, 2006). CaRim101 und CaNrg1 scheinen dabei in *C. albicans* eine antagonistische Funktion einzunehmen, obwohl beide an der Regulation der Hyphenbildung beteiligt sind. Während CaRim101 die Hyphenbildung positiv beeinflusst, ist CaNrg1 als negativer Regulator des hyphalen Wachstums bekannt. Daher geht man für *C. albicans* davon aus, dass beide Transkriptionsfaktoren unabhängig voneinander in unterschiedlichen Signalwegen wirken (Bensen *et al.*, 2004).

### 3.5 Einfluss von alkalischem pH auf die Flo11-abhängige Hefezelladhäsion

Um den durch pH 8-Bedingungen ausgelösten Verlust der Flo11-abhängigen Adhäsion einerseits und das Flo11-unabhängige Verklumpen der Hefezellen andererseits verstehen zu können, bedarf es einer genaueren Betrachtung der Hefezellwand.

Die detailliertesten Analysen der Hefezellwand sind bisher für *S. cerevisiae* durchgeführt worden und basieren im Wesentlichen auf Löslichkeitsstudien mit Zellwandkomponenten während der Extraktion von isolierten und gereinigten Zellwänden unter sauren und alkalischen Bedingungen bei verschiedenen Temperaturen (Fleet, 1991; Klis, 1994). Die wichtigsten Komponenten der Hefezellwand machen vor

allem das 1,3- $\beta$ -Glucan (50-55 % Trockenmasse), die Mannoproteine (35-40 % Trockenmasse), das 1,6- $\beta$ -Glucan (5-10 % Trockenmasse) und Chitin (2 % Trockenmasse) aus (Klis *et al.*, 2002). Die Hefezellwand besteht aus zwei unterschiedlichen Schichten (Osumi, 1998). Die äußere Schicht ist hauptsächlich aus Mannoproteinen aufgebaut und umschließt die innere  $\beta$ -Glucanschicht. Den Hauptbestandteil der inneren Zellwandschicht bildet das 1,3- $\beta$ -Glucan-Chitin. Über 1,6- $\beta$ -Glucan wird eine Verbindung der Komponenten von innerer und äußerer Zellwandschicht hergestellt. Die Mannoproteine der äußeren Zellwandschicht sind stark N- und O-glykosyliert und reduzieren die Durchlässigkeit der Zellwand. Zellwandproteine werden entweder indirekt durch einen 1,6- $\beta$ -Glucan-Rest oder direkt an das 1,3- $\beta$ -Glucan-Chitin geknüpft (Klis *et al.*, 2002; Lipke & Ovalle, 1998). Man kann davon ausgehen, dass auch Flo11 nach erfolgreicher Sekretion und Abtrennung des GPI-Ankers über seinen Ankerrest kovalent mit dem  $\beta$ -1,6-Glucan der Zellwand verknüpft wird (Bowman & Free, 2006; Klis *et al.*, 2002; Lipke & Ovalle, 1998; Lu *et al.*, 1995; Pittet & Conzelmann, 2007). Eine weitere Zellwand-Einbindung von Flo11 erfolgt darüber hinaus wahrscheinlich durch seine Glykosylierungen, wodurch es ein zentraler Zellwandbestandteil wird (Dranginis *et al.*, 2007; Smukalla *et al.*, 2008).

Für die Hefezellwand ist bekannt, dass sie bereits nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur in 1 N KOH in eine wasserlösliche Glucan-Mannan und schwer wasserlösliche Glucan-Fraktion aufgetrennt werden kann (Kessler & Nickerson, 1959). Die alkalisch lösliche Glucan-Fraktion setzt sich dabei hauptsächlich aus 1,3- $\beta$ -Glucan, Mannan und geringen Mengen an 1,6- $\beta$ -Glucan zusammen (Dallies *et al.*, 1998). Für alkalisch lösbares Glucan konnte nach der Neutralisation mit Wasser außerdem eine Präzipitation als Gel nachgewiesen werden (Fleet & Manners, 1976). Die in dieser Arbeit für Versuche unter alkalischen Umgebungsbedingungen (pH 8) gewählte Pufferkonzentration wurde absichtlich sehr gering gewählt und lag mit 25 mM Hepes deutlich unter den in anderen Arbeiten gewählten Pufferkonzentrationen (Causton *et al.*, 2001; Lamb *et al.*, 2001). Zwar wurde die Zellwand unter pH 8-Bedingungen nicht abgedaut, alkalische Umgebungsbedingungen führen aber zu einer sichtbaren Veränderung der Zelloberfläche, wie durch die SEM-Aufnahmen bestätigt werden konnte. Wahrscheinlich wird unter alkalischen pH-Bedingungen insbesondere das Glucan-Mannan angedaut, was zu einem Verkleben der Zellen untereinander führt. Während eine *flo11* $\Delta$ -Mutante eine raue Zelloberfläche aufweist, scheint in Gegenwart

von Flo11 die Zelloberfläche stabilisiert zu werden. So zeigten die SEM-Aufnahmen für den Wildtypstamm unter pH 8-Bedingungen eine glatte Oberfläche und die verklumpten Zellen wiesen eine Gallert-artig überzogene Oberfläche auf. Ein Andauen der Zellwand, die als integralen Bestandteil Flo11 enthält, führt in der Konsequenz wahrscheinlich zu einer Fehlausrichtung oder einer Einbettung des Adhäsins in die Zelloberfläche derart, dass es seine funktionellen Eigenschaften verliert. Ein Verlust der adhäsiven Eigenschaften unabhängig von der Veränderung der Zelloberfläche durch direkten Kontakt des Proteins mit alkalischem Milieu ist aber ebenso denkbar.



## 4 Material

### 4.1 Chemikalien

#### 4.1.1 Bezugsquellen von Chemikalien, Enzymen und Kits

Chemikalien zur Herstellung von Lösungen, Puffern und Medien wurden von den Firmen MERCK KGaA (Darmstadt, D), CARL ROTH GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D), FLUKA (SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, D), SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH (Steinheim, D) und VWR International GmbH (Darmstadt, D) bezogen.

Restriktions- und Modifikationsenzyme wurden von der FERMENTAS GmbH (St. Leon-Rot, D) und NEW ENGLAND BIOLABS Inc. (Frankfurt, D) geordert. Als DNA-Größenstandards wurden „Gene Ruler 1 kb DNA Ladder“, „Gene Ruler 100 bp DNA Ladder“ und „Gene Ruler 50 bp DNA Ladder“ (FERMENTAS GmbH, St. Leon-Rot, D) verwendet. RNaseA wurde von der METABION INTERNATIONAL AG (Martinsried, D) bezogen.

„KOD-Hifi“-DNA-Polymerase wurde von NOVAGEN (MERCK KGaA, Darmstadt, D), „Taq-DNA“-Polymerase von der METABION INTERNATIONAL AG (Martinsried, D) und „Phusion<sup>TM</sup> High-Fidelity“-DNA-Polymerase von FINNZYMES (FISHER SCIENTIFIC GmbH, Schwerte, D) geordert.

Synthetische Oligonukleotide wurden von METABION INTERNATIONAL AG (Martinsried, D) synthetisiert.

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das „Plasmid Mini Kit“, zur Extraktion von DNA aus Agarosegelen das „QIAquick<sup>®</sup> Gel Extraction Kit“, sowie zur RNA-Isolation aus *S. cerevisiae* für das Transkriptprofiling das „RNeasy Mini Kit“ von der QIAGEN GMBH (Hilden, D) verwendet. Für die Transkriptomanalyse wurden Kits nach Vorgabe des „GeneChip<sup>®</sup> Expression Analysis Technical Manual“ (AFFYMETRIX GmbH) verwendet.

Die Sequenzierungen erfolgten bei SEQUENCE LABORATORIES GmbH (Göttingen, D).

Antikörper wurden von SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY Inc. (CA, USA), SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH (Steinheim, D) und CALBIOCHEM (MERCK KGaA, Darmstadt, D) produziert.

Es wurden Proteingelapparaturen und Geldokumentationsanlagen von der BIO-RAD LABORATORIES GmbH (München, D) verwendet.

Alle Zentrifugationen von Volumina bis 2 ml erfolgten in Zentrifugen der HERAEUS HOLDING GmbH (Hanau, D): Zentrifugationen bei Raumtemperatur erfolgten, sofern nicht anders angegeben, in einer Tischzentrifuge „Biofuge pico“, alle Zentrifugationen bei 4 °C in einer Tisch-Kühlzentrifuge „Biofuge fresco“. Zentrifugationen von Volumina über 2 ml wurden in einer Stand-Kühlzentrifuge „4K-15“ der SIGMA LABORZENTRIFUGEN GmbH (Osterode am Harz, D) durchgeführt.

Die „Cellstar® TC-48-Well“-Polystyrol-Mikrotiterplatten (Cat. No. 677180) sowie die 96-Well-Polystyrol-Mikrotiterplatten wurden von GREINER BIO-ONE GmbH (Kremsmünster, A) erworben. Weitere Labor-Verbrauchsmaterialien wurden von der SARSTEDT AG & Co. (Nümbrecht, D) bezogen.

Bezugsquellen der in dieser Arbeit verwendeten Produkte:

AFFYMETRIX GmbH (München, D)

AGILENT TECHNOLOGIES DEUTSCHLAND GmbH (Böblingen, D)

BALZERS UNION AG ( Balzers, FL)

BECTON DICKINSON GmbH (Heidelberg, D)

BIBBY SCIENTIFIC Limited (Staffordshire, UK)

BIO-RAD LABORATORIES GmbH (München, D)

BRANSON ULTRASCHALL (EMERSON TECHNOLOGIES GmbH & Co. OHG, Dietzenbach, D)

CALBIOCHEM (MERCK KGaA, Darmstadt, D)

CANON DEUTSCHLAND GmbH (Krefeld, D)

CARL ROTH GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)

CARL ZEISS AG (Oberkochen, D)

DIANOVA GmbH (Hamburg, D)

EPSON DEUTSCHLAND GmbH (Meerbusch, D)

EUROSCARF (Frankfurt, D)

FERMENTAS GmbH (St. Leon-Rot, D)

FINNZYMES (FISHER SCIENTIFIC GmbH, Schwerte, D)  
FISHER SCIENTIFIC GmbH (Schwerte, D)  
FLUKA (SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, D)  
GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES (München, D)  
GREINER BIO-ONE GmbH (Kremsmünster, A)  
HERAEUS HOLDING GmbH (Hanau, D)  
HITACHI HIGH-TECHNOLOGIES EUROPE GmbH (Krefeld, D)  
MICROBIA Inc. (Cambridge, Massachusetts, USA)  
IKA WERKE GmbH & Co. KG (Staufen, D)  
INTAS SCIENCE IMAGING INSTRUMENTS GmbH (Göttingen, D)  
KONICA MINOLTA MEDICAL & GRAPHIC Inc. (Tokyo, JP)  
MERCK KGaA (Darmstadt, D)  
METABION INTERNATIONAL AG (Martinsried, D)  
MILIPORE GmbH (Schwalbach, D)  
NEW ENGLAND BIOLABS Inc. (Frankfurt, D)  
NOVAGEN (MERCK KGaA, Darmstadt, D)  
PEQLAB BIOTECHNOLOGIE GmbH (Erlangen, D)  
POINT ELECTRONIC GmbH (Halle (Saale), D)  
QIAGEN GmbH (Hilden, D)  
ROCHE GmbH (Mannheim, D)  
SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY Inc. (Heidelberg, D)  
SARSTEDT AG & Co. (Nümbrecht, D)  
SCHLEICHER & SCHUELL BIOSCIENCE GmbH (Dassel, D)  
SEQUENCE LABORATORIES GmbH (Göttingen, D)  
SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH (Steinheim, D)  
SIGMA LABORZENTRIFUGEN GmbH (Osterode am Harz, D)  
STRATAGENE (AGILENT TECHNOLOGIES SALES & SERVICES GmbH & Co. KG, Waldbronn, D)  
VWR INTERNATIONAL GmbH (Darmstadt, D)

#### 4.1.2 Puffer und Lösungen

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Lösungen und Puffer aufgeführt (Tabelle 8). Sofern im Methodenteil nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Lösungen und Puffer in deionisiertem Wasser angesetzt.

**Tabelle 8: Verwendete Lösungen und Puffer**

| <b>Bezeichnung</b>    | <b>Zusammensetzung</b>   |
|-----------------------|--|
| Aufbruch-Puffer       | 100 mM Tris-HCl pH 8,0<br>20 % (v/v) Glycerin  |
| Cross-RNA-Puffer I    | 10 mM Tris-HCl pH 7<br>0,3 M NaCl<br>1 mM EDTA pH 8<br>0,2 % (w/v) SDS   |
| Cross-RNA-Puffer II   | TE-Puffer<br>0,2 % (w/v) SDS   |
| CDP-Star-Lösung       | 100 µl CDP-Star (Cat. No.11 685 627 001;<br>ROCHE GmbH) in 10 ml DIG3 (1:100)  |
| DIG1                  | 0,1 M Maleinsäure<br>0,15 M NaCl<br>auf pH 7,5 mit NaOH einstellen<br>autoklavieren  |
| DIG2                  | Blockierungslösung.1:10 in DIG1<br>10-fach Blocklösung: Blocking Reagent<br>(Cat. No.11 096 176 001; ROCHE GmbH)<br>angesetzt laut Hersteller      |
| DIG3                  | 0,1 Tris-Base<br>0,1 M NaCl<br>auf pH 9,5 mit HCl einstellen<br>sterilfiltrieren   |
| DIG-Waschpuffer       | 0,3 % Tween-20 (v/v) in DIG1<br>frisch ansetzen  |
| DNA-Ladepuffer (6 x)  | 10 mM Tris-HCl pH 7,6<br>0,03 % (w/v) Bromphenolblau<br>0,03 % (w/v) Xylencyanol FF<br>0,15 % (w/v) Orange G,<br>60 % (v/v) Glycerin<br>60 mM EDTA |
| Elektrophorese-Puffer | 25 mM Tris Base<br>250 mM Glycin<br>1 % (w/v) SDS  |
| Elutionspuffer        | 10 mM Tris-HCl pH 8,5  |

| Bezeichnung                     | Zusammensetzung  |
|---------------------------------|--|
| Ligationspuffer                 | 10 mM MgCl <sub>2</sub><br>10 mM DTT<br>0,6 mM ATP<br>20 mM Tris-HCl pH 7,6  |
| LiPEG                           | 1 mM EDTA<br>100 mM Lithium-Acetat<br>40 % PEG4000<br>10 mM Tris-HCl<br>auf pH 8,0 mit Essigsäure einstellen<br>sterilfiltrieren |
| LiSORB                          | 1 mM EDTA<br>100 mM Lithium-Acetat<br>1 M Sorbitol<br>10 mM Tris-HCl<br>auf pH 8,0 mit Essigsäure einstellen<br>sterilfiltrieren |
| Lösung 1 (Plasmidisolation)     | 10 mM EDTA pH 8,0<br>50 mM Glucose<br>25 mM Tris-HCl pH 8,0  |
| Lösung 2 (Plasmidisolation)     | 0,2 M NaOH<br>1 % (w/v) SDS  |
| Lösung 3 (Plasmidisolation)     | 5 M Kalium-Acetat<br>2 M Essigsäure  |
| Luminol-Lösung                  | 100 mM Tris-HCl pH 8,5<br>2,5 mM 3-Aminophtalhydrazid (Luminol)<br>0,4 mM p-Cumarsäure   |
| Lysierungspuffer „Smash & Grab“ | 2 % (v/v) Triton X-100<br>1 % (w/v) SDS<br>100 mM NaCl<br>1 mM EDTA<br>10 mM Tris-HCl pH 8,0                                     |
| MOPS-Puffer (10-fach)           | 2 M MOPS<br>800 mM NaOAc<br>100 mM EDTA<br>pH 7 mit HCl einstellen<br>sterilfiltrieren   |
| Northern-Waschpuffer            | 30 mM Tri-Natriumcitrat-Dihydrat<br>0,3 M NaCl<br>0,1 % (w/v) SDS<br>pH 7 mit NaOH einstellen                                    |
| Osmiumtetroxid-Lösung           | 100 mg OsO <sub>4</sub> (w/v)<br>10 ml Sörensen-Puffer<br>24 h vorher ansetzen<br>dunkel und kühl lagern                         |

| Bezeichnung          | Zusammensetzung  |
|----------------------|--|
| Phosphat-Puffer      | 137 mM NaCl<br>2,7 mM KCl<br>4,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>1,47 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>einstellen auf pH 7,4<br>autoklavieren  |
| PMSF-Lösung          | 100 mM PMSF in Isopropanol   |
| Ponceau S-Lösung     | 1 % (w/v) Ponceau S<br>1 % (w/v) Essigsäure  |
| RNA-Ladepuffer (6x)  | 1x MOPS<br>5 % (w/v) Bromphenolblau,<br>5 % (w/v) Xylencyanolblau<br>50 % (v/v) Glycerin   |
| SDS-Ladepuffer (3x)  | 15 % β-Mercapthoethanol<br>30 % Glycerol<br>7 % SDS<br>0,3 % Bromphenolblau<br>0,25 M Tris-HCl pH 6,8  |
| SN-Hyb.-Puffer       | 0,5 M Na-Phosphatpuffer<br>0,7 % (w/v) DS<br>auf pH 7 einstellen<br>autoklavieren  |
| Sörensen-Puffer      | 100 ml Puffer pH 7,2:<br>38,8 ml Lsg. A + 61,2 ml Lsg. B<br>Lösung A: 9,1 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in 1 l dH <sub>2</sub> O<br>Lösung B: 11,9 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> in 1l H <sub>2</sub> O |
| SSC-Puffer (10-fach) | 1,5 M NaCl<br>150 mM Tri-Natriumcitrat-Dihydrat<br>autoklavieren   |
| Southern-Waschpuffer | 0,1 M Na-Phosphatpuffer<br>3 % (w/v) SDS<br>auf pH 7 einstellen<br>autoklavieren   |
| Stripping-Puffer     | 100 mM NaOH<br>2 % (w/v) SDS<br>0,5 % DTT  |
| TAE-Puffer           | 40 mM Tris-Acetat<br>20 mM Na-Acetat<br>2 mM EDTA<br>auf pH 8,3 einstellen   |

| Bezeichnung               | Zusammensetzung  |
|---------------------------|--|
| TB-Puffer                 | 10 mM Hepes<br>15 mM CaCl <sub>2</sub><br>250 mM KCl<br>55 mM MnCl <sub>2</sub><br>pH 6,7 einstellen   |
| TBS-Puffer                | 50 mM Tris-HCl pH 7,5<br>150 mM NaCl   |
| TBS-T-Puffer              | TBS-Puffer<br>0,1 % (v/v) Tween-20   |
| TE-Puffer                 | 10 mM Tris-HCl pH 8,0<br>1 mM EDTA   |
| Transfer-Puffer           | 25 mM Tris-Base<br>200 mM Glycin<br>20 % (v/v) Methanol  |
| Wasserstoffperoxid-Lösung | 100 mM Tris-HCl pH 8,5<br>5,4 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>   |
| Z-Puffer                  | 60 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>40 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>10 mM KCl<br>1 mM MgSO <sub>4</sub><br>0,25 % (v/v) β-Mercapthoethanol |

#### 4.1.3 Antibiotika

In Tabelle 9 sind die in dieser Arbeit genutzten Antibiotika aufgeführt. Sie wurden Fest- bzw. Flüssigmedien nach dem Autoklavieren und Abkühlen unter 60 °C zugegeben. Die Stammlösungen wurden in dH<sub>2</sub>O angesetzt.

**Tabelle 9: Verwendete Antibiotika**

| Bezeichnung      | Stammlösung | Endkonzentration | Bezugsquelle            |
|------------------|-------------|------------------|-------------------------|
| Ampicillin       | 100 mg/ml   | 100 µg/ml        | CARL ROTH GmbH & Co. KG |
| G418 (Geneticin) | 200 mg/ml   | 200 µg/ml        | CARL ROTH GmbH & Co. KG |

#### 4.1.4 Nährmedien

Im Folgenden sind die verwendeten Nährmedien und benötigten Stammlösungen aufgeführt (Tabelle 10). Mit dH<sub>2</sub>O wurde auf das gewünschte Endvolumen aufgefüllt. Bei Festmedien wurde eine zweifach konzentrierte Lösung angesetzt, die nach dem Autoklavieren mit dem gleichen Volumen 4%igen Agars gemischt wurde. Kohlenstoffquellen wurden nach dem Autoklavieren supplementiert.

**Tabelle 10: Nährmedien und Stammlösungen**

| <b>Bezeichnung</b>   | <b>Zusammensetzung</b>  |
|--|---|
| Aminosäuremischung   | 2 g aller Standard-L-Aminosäuren außer L-Histidin, L-Leucin und L-Tryptophan)<br>0,2 g p-Aminobenzoat   |
| LB-Medium<br>(Lysogeny Broth)  | 1 % (w/v) (Pepton aus tryptisch verdaulichem Casein<br>0,5 % (w/v) Hefeextrakt<br>1 % (w/v) NaCl  |
| SC-4-Medium<br>(Synthetic Complete ohne Uracil, Leucin, Tryptophan und Histidin) | 0,15 % (w/v) Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat<br>0,5 % (w/v) Ammoniumsulfat<br>0,2 mM myo-Inositol<br>0,2 % (w/v) Aminosäuremischung |
| SOB-Medium   | 2 % (w/v) Trypton<br>0,5 % (w/v) Hefeextrakt<br>2,5 mM KCl<br>10 mM NaCl<br>10 mM MgCl <sub>2</sub><br>10 mM MgSO <sub>4</sub>                              |
| SOC-Medium   | SOB-Medium<br>20 mM Glukose   |
| YNB-Medium<br>(Yeast Nitrogen Base)  | 0,15 % (w/v) Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat<br>0,5 % (w/v) Ammoniumsulfat<br>0,2 mM myo-Inositol                                   |
| YPD-Medium<br>(Yeast Extract, Peptone, Dextrose)                                 | 2 % (w/v) Pepton aus tryptisch verdaulichem Casein<br>1 % (w/v) Hefeextrakt<br>2 % (w/v) Glucose  |
| YPG-Medium<br>(Yeast Extract, Peptone, Galactose)                                | 2 % (w/v) Pepton aus tryptisch verdaulichem Casein<br>1 % (w/v) Hefeextrakt<br>2 % (w/v) Galactose  |



#### 4.1.5 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle 11 bzw. Tabelle 12 angegeben.

**Tabelle 11: Die in dieser Arbeit verwendeten Primär-Antikörper**

| <b>Bezeichnung</b>   | <b>Verdünnung</b> | <b>Bezugsquelle</b>                          |
|--|-------------------|--|
| anti-Digoxigenin-AP, Fab Fragment                                  | 1:10.000          | Cat. No.11 093 274 910<br>ROCHE GmbH         |
| anti-HA Antikörper<br>(Ursprung: Maus; monoklonal)                 | 1:1.000           | Cat. No. H3663<br>SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH  |
| anti-Cdc28 Antikörper<br>(Ursprung: Ziege; polyklonal)             | 1:1.000           | Cat. No. SC-6709<br>SANTA-CRUZ BIOTECH. Inc. |
| anti- $\alpha$ -Tubulin Antikörper<br>(Ursprung: Maus; monoklonal) | 1:10.000          | Cat. No. CP06<br>CALBIOCHEM, MERCK KGaA      |

**Tabelle 12: Die in dieser Arbeit verwendeten Sekundär-Antikörper**

| <b>Bezeichnung</b>   | <b>Verdünnung</b> | <b>Bezugsquelle</b>                            |
|--|-------------------|--|
| anti-Maus Antikörper<br>Meerrettichperoxidase-gekoppelt<br>(Ursprung: Ziege; polyklonal) | 1:4.000           | Cat. No. 115-035-003<br>DIANOVA GmbH           |
| anti-Ziege Antikörper<br>Meerrettichperoxidase-gekoppelt<br>(Ursprung: Esel)             | 1:3.000           | Cat. No. SC-2020<br>SANTA-CRUZ BIOTECH. Inc.   |
| anti-Maus Antikörper, F(abN) <sub>2</sub><br>Cy3-konjugiert<br>(Ursprung: Ziege)         | 1:750             | Cat. No. C2181<br>SIGMA-ALDRICH CHEMIE<br>GmbH |

#### 4.1.6 Polyacrylamid-Gele

Die Zusammensetzung der verwendeten Polyacrylamid-Gele ist in Tabelle 13 angegeben.

Tabelle 13: Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten Polyacrylamid-Gele

| Chemikalien                     | Trenngel       | Sammelgel     |
|---------------------------------|----------------|---------------|
|                                 | 10 % Acrylamid | 4 % Acrylamid |
| Rotiphorese® Gel 30 (CARL ROTH) | 3,34 ml        | 1,33 ml       |
| dH <sub>2</sub> O               | 2,71 ml        | 5,97 ml       |
| 1 M Tris-HCl pH 8,8             | 3,75 ml        | -             |
| 0,5 M Tris-HCl pH 6,8           | -              | 2,5 ml        |
| SDS-Lsg. (10%ig)                | 100 µl         | 100 µl        |
| APS (10%ig)                     | 100 µl         | 100 µl        |
| TEMED                           | 5 µl           | 5 µl          |

## 4.2 Stämme, Plasmide und Oligonukleotide

### 4.2.1 *S. cerevisiae*-Stämme

Die in dieser Arbeit verwendeten *S. cerevisiae*-Stämme sind in Tabelle 14 aufgeführt. Mit Ausnahme von YHUM1800 (S288c-Stammhintergrund) sind alle aufgeführten Stämme Abkömmlinge des  $\Sigma$ 1278b-Stammhintergrunds. Werden außer der systematischen Benennung „YHUM“ weitere Stammnamen angegeben, beziehen sich diese auf die angegebene Referenz.

Tabelle 14: Die in dieser Arbeit verwendeten *S. cerevisiae*-Stämme

| Stamm    | Genotyp   | Referenz                     |
|----------|---|------------------------------|
| YHUM0216 | <i>ura3-52, his::hisG, leu2::hisG, MATa. <math>\Sigma</math>1278b.</i>          | Stammsammlung AG Mösch       |
| YHUM0458 | <i>leu2<math>\Delta</math>0, MATa. <math>\Sigma</math>1278b.</i>                | $\Sigma$ 2000, MICROBIA Inc. |
| YHUM0909 | <i>ura3-52, MATa. <math>\Sigma</math>1278b.</i>                                 | Stammsammlung AG Mösch       |
| YHUM0924 | <i>flo11<math>\Delta</math>::kanR, ura3-52, MATa. <math>\Sigma</math>1278b.</i> | Stammsammlung AG Mösch       |
| YHUM1455 | <i>dfg16<math>\Delta</math>::loxP, ura3-52, MATa. <math>\Sigma</math>1278b.</i> | diese Arbeit                 |

Die *dfg16 $\Delta$ ::kanMX4*-Deletionskassette wurde mit Hilfe der Primer fw\_DFG16 und rev\_DFG16 aus pUG6 (BHUM0966) amplifiziert und chromosomal in YHUM0909 integriert. Der Deletionsstamm wurde mit pSH47 (BHUM0094) transformiert und der *kanMX4*-Marker durch Induktion der Cre-Rekombinase regeneriert (Güldener *et al.*, 1996). Überprüft durch eine Southern-Hybridisierung mit einer Sonde aus fw\_DFG16\_SP und rev\_DFG16\_SP.

| Stamm    | Genotyp  | Referenz                       |
|----------|--|--------------------------------|
| YHUM1459 | <i>nrg1Δ::loxP, ura3-52, MATa</i> . Σ1278b.<br><br>Die <i>nrg1Δ::kanMX4</i> -Deletionskassette wurde mit Hilfe der Primer fw_NRG1 und rev_NRG1 aus pUG6 (BHUM0966) amplifiziert und chromosomal in YHUM0909 integriert. Der Deletionsstamm wurde mit pSH47 (BHUM0094) transformiert und der <i>kanMX4</i> -Marker durch Induktion der Cre-Rekombinase regeneriert (Güldener <i>et al.</i> , 1996). Überprüft durch eine Southern-Hybridisierung mit einer Sonde aus fw_NRG1_SP und rev_NRG1_SP.                | diese Arbeit                   |
| YHUM1461 | <i>rim101Δ::loxP, ura3-52, MATa</i> . Σ1278b.<br><br>Die <i>rim101Δ::kanMX4</i> -Deletionskassette wurde mit Hilfe der Primer fw_RIM101 und rev_RIM101 aus pUG6 (BHUM0966) amplifiziert und chromosomal in YHUM0909 integriert. Der Deletionsstamm wurde mit pSH47 (BHUM0094) transformiert und der <i>kanMX4</i> -Marker durch Induktion der Cre-Rekombinase regeneriert (Güldener <i>et al.</i> , 1996). Überprüft durch eine Southern-Hybridisierung mit einer Sonde aus fw_RIM101_SP und rev_RIM101_SP.    | diese Arbeit                   |
| YHUM1463 | <i>smp1Δ::loxP, ura3-52, MATa</i> . Σ1278b.<br><br>Die <i>smp1Δ::kanMX4</i> -Deletionskassette wurde mit Hilfe der Primer fw_SMP1 und rev_SMP1 aus pUG6 (BHUM0966) amplifiziert und chromosomal in YHUM0909 integriert. Der Deletionsstamm wurde mit pSH47 (BHUM0094) transformiert und der <i>kanMX4</i> -Marker durch Induktion der Cre-Rekombinase regeneriert (Güldener <i>et al.</i> , 1996). Überprüft durch eine Southern-Hybridisierung mit einer Sonde aus fw_SMP1_SP und rev_SMP1_SP.                | diese Arbeit                   |
| YHUM1514 | <i>nrg2Δ::loxP, ura3-52, MATa</i> . Σ1278b.<br><br>Die <i>nrg2Δ::kanMX4</i> -Deletionskassette wurde mit Hilfe der Primer fw_NRG2 und rev_NRG2 aus pUG6 (BHUM0966) amplifiziert und chromosomal in YHUM0909 integriert. Der Deletionsstamm wurde mit pSH47 (BHUM0094) transformiert und der <i>kanMX4</i> -Marker durch Induktion der Cre-Rekombinase regeneriert (Güldener <i>et al.</i> , 1996). Überprüft durch eine Southern-Hybridisierung mit einer Sonde aus fw_NRG2_SP und rev_NRG2_SP.                | diese Arbeit                   |
| YHUM1522 | <i>rim101Δ::loxP, nrg1Δ::loxP, ura3-52, MATa</i> . Σ1278b.<br><br>Die <i>nrg1Δ::kanMX4</i> -Deletionskassette wurde mit Hilfe der Primer fw_NRG1 und rev_NRG1 aus pUG6 (BHUM0966) amplifiziert und chromosomal in YHUM1461 integriert. Der Deletionsstamm wurde mit pSH47 (BHUM0094) transformiert und der <i>kanMX4</i> -Marker durch Induktion der Cre-Rekombinase regeneriert (Güldener <i>et al.</i> , 1996). Überprüft durch eine Southern-Hybridisierung mit einer Sonde aus fw_NRG1_SP und rev_NRG1_SP. | diese Arbeit &<br>(Mark, 2008) |
| YHUM1524 | <i>rim101Δ::loxP, smp1Δ::loxP, ura3-52, MATa</i> . Σ1278b.<br><br>Die <i>smp1Δ::kanMX4</i> -Deletionskassette wurde mit Hilfe der Primer fw_SMP1 und rev_SMP1 aus pUG6 (BHUM0966) amplifiziert und chromosomal in YHUM1461 integriert. Der Deletionsstamm wurde mit pSH47 (BHUM0094) transformiert und der <i>kanMX4</i> -Marker durch Induktion der Cre-Rekombinase regeneriert (Güldener <i>et al.</i> , 1996). Überprüft durch eine Southern-Hybridisierung mit einer Sonde aus fw_SMP1_SP und rev_SMP1_SP. | diese Arbeit &<br>(Mark, 2008) |
| YHUM1528 | <i>rim101Δ::kanMX4, leu2Δ0, MATa</i> . Σ1278b.<br><br>Die <i>rim101Δ::kanMX4</i> -Deletionskassette wurde mit Hilfe der Primer fw_RIM101 und rev_RIM101 aus pUG6 (BHUM0966) amplifiziert und chromosomal in YHUM0458 integriert (Güldener <i>et al.</i> , 1996). Überprüft durch eine Southern-Hybridisierung mit einer Sonde aus fw_RIM101_SP und rev_RIM101_SP.  | diese Arbeit                   |

| Stamm    | Genotyp  | Referenz                       |
|----------|--|--------------------------------|
| YHUM1530 | <i>nrg1Δ::loxP, nrg2Δ::loxP, ura3-52, MATa. Σ1278b.</i><br><br>Die <i>nrg2Δ::kanMX4</i> -Deletionskassette wurde mit Hilfe der Primer fw_NRG2 und rev_NRG2 aus pUG6 (BHUM0966) amplifiziert und chromosomal in YHUM1459 integriert. Der Deletionsstamm wurde mit pSH47 (BHUM0094) transformiert und der <i>kanMX4</i> -Marker durch Induktion der Cre-Rekombinase regeneriert (Güldener <i>et al.</i> , 1996). Überprüft durch eine Southern-Hybridisierung mit einer Sonde aus fw_NRG2_SP und rev_NRG2_SP.                | diese Arbeit &<br>(Mark, 2008) |
| YHUM1564 | <i>rim101Δ::loxP, nrg1Δ::loxP, nrg2Δ::loxP, ura3-52, MATa. Σ1278b.</i><br><br>Die <i>nrg2Δ::kanMX4</i> -Deletionskassette wurde mit Hilfe der Primer fw_NRG2 und rev_NRG2 aus pUG6 (BHUM0966) amplifiziert und chromosomal in YHUM1522 integriert. Der Deletionsstamm wurde mit pSH47 (BHUM0094) transformiert und der <i>kanMX4</i> -Marker durch Induktion der Cre-Rekombinase regeneriert (Güldener <i>et al.</i> , 1996). Überprüft durch eine Southern-Hybridisierung mit einer Sonde aus fw_NRG2_SP und rev_NRG2_SP. | diese Arbeit &<br>(Mark, 2008) |
| YHUM1566 | <i>rim101Δ::loxP, smp1Δ::loxP, nrg1Δ::loxP, ura3-52, MATa. Σ1278b.</i><br><br>Die <i>nrg1Δ::kanMX4</i> -Deletionskassette wurde mit Hilfe der Primer fw_NRG1 und rev_NRG1 aus pUG6 (BHUM0966) amplifiziert und chromosomal in YHUM1524 integriert. Der Deletionsstamm wurde mit pSH47 (BHUM0094) transformiert und der <i>kanMX4</i> -Marker durch Induktion der Cre-Rekombinase regeneriert (Güldener <i>et al.</i> , 1996). Überprüft durch eine Southern-Hybridisierung mit einer Sonde aus fw_NRG1_SP und rev_NRG1_SP. | diese Arbeit &<br>(Mark, 2008) |
| YHUM1570 | <i>rim101Δ::loxP, nrg2Δ::loxP, ura3-52, MATa. Σ1278b.</i><br><br>Die <i>nrg2Δ::kanMX4</i> -Deletionskassette wurde mit Hilfe der Primer fw_NRG2 und rev_NRG2 aus pUG6 (BHUM0966) amplifiziert und chromosomal in YHUM1461 integriert. Der Deletionsstamm wurde mit pSH47 (BHUM0094) transformiert und der <i>kanMX4</i> -Marker durch Induktion der Cre-Rekombinase regeneriert (Güldener <i>et al.</i> , 1996). Überprüft durch eine Southern-Hybridisierung mit einer Sonde aus fw_NRG2_SP und rev_NRG2_SP.              | diese Arbeit &<br>(Mark, 2008) |
| YHUM1574 | <i>smp1Δ::loxP, nrg2Δ::kanMX4, ura3-52, MATa. Σ1278b.</i><br><br>Die <i>nrg2Δ::kanMX4</i> -Deletionskassette wurde mit Hilfe der Primer fw_NRG2 und rev_NRG2 aus pUG6 (BHUM0966) amplifiziert und chromosomal in YHUM1463 integriert (Güldener <i>et al.</i> , 1996). Überprüft durch eine Southern-Hybridisierung mit einer Sonde aus fw_NRG2_SP und rev_NRG2_SP.   | diese Arbeit &<br>(Mark, 2008) |
| YHUM1576 | <i>rim101Δ::loxP, smp1Δ::loxP, nrg2Δ::kanMX4, ura3-52, MATa. Σ1278b.</i><br><br>Die <i>nrg2Δ::kanMX4</i> -Deletionskassette wurde mit Hilfe der Primer fw_NRG2 und rev_NRG2 aus pUG6 (BHUM0966) amplifiziert und chromosomal in YHUM1524 integriert (Güldener <i>et al.</i> , 1996). Überprüft durch eine Southern-Hybridisierung mit einer Sonde aus fw_NRG2_SP und rev_NRG2_SP.  | diese Arbeit &<br>(Mark, 2008) |
| YHUM1578 | <i>NRG1-3HA-CaURA3, ura3-52, MATa. Σ1278b.</i><br><br>Die <i>3HA-CaURA3</i> -Markierungskassette wurde mit Hilfe der Primer S3_fw_NRG1_3HA und S2_rev_NRG1_3HA aus BHUM1300 amplifiziert und chromosomal C-terminal hinter <i>NRG1</i> in YHUM0909 integriert (Knop <i>et al.</i> , 1999). Überprüft durch PCR mit den Primern fw_NRG1_Cterm und rev_NRG1_Cterm.   | diese Arbeit                   |

| Stamm            | Genotyp  | Referenz                   |
|------------------|--|----------------------------|
| YHUM1580         | <i>NRG2-3HA-CaURA3, ura3-52, MATa. <math>\Sigma</math>1278b.</i><br><br>Die <i>3HA-CaURA3</i> -Markierungskassette wurde mit Hilfe der Primer S3_fw_NRG2_3HA und S2_rev_NRG2_3HA aus BHUM1300 amplifiziert und chromosomal C-terminal hinter <i>NRG2</i> in YHUM0909 integriert (Knop <i>et al.</i> , 1999). Überprüft durch PCR mit den Primern fw_NRG2_Cterm und rev_NRG2_Cterm.   | diese Arbeit               |
| YHUM1582         | <i>SMP1-3HA-CaURA3, ura3-52, MATa. <math>\Sigma</math>1278b.</i><br><br>Die <i>3HA-CaURA3</i> -Markierungskassette wurde mit Hilfe der Primer S3_fw_SMP1_3HA und S2_rev_SMP1_3HA aus BHUM1300 amplifiziert und chromosomal C-terminal hinter <i>SMP1</i> in YHUM0909 integriert (Knop <i>et al.</i> , 1999). Überprüft durch PCR mit den Primern fw_SMP1_Cterm und rev_SMP1_Cterm.   | diese Arbeit               |
| YHUM1584         | <i>NRG1-3HA-CaURA3, rim101<math>\Delta</math>::loxP, ura3-52, MATa. <math>\Sigma</math>1278b.</i><br><br>Die <i>3HA-CaURA3</i> -Markierungskassette wurde mit Hilfe der Primer S3_fw_NRG1_3HA und S2_rev_NRG1_3HA aus BHUM1300 amplifiziert und chromosomal C-terminal hinter <i>NRG1</i> in YHUM1461 integriert (Knop <i>et al.</i> , 1999). Überprüft durch PCR mit den Primern fw_NRG1_Cterm und rev_NRG1_Cterm.                          | diese Arbeit               |
| YHUM1586         | <i>NRG2-3HA-CaURA3, rim101<math>\Delta</math>::loxP, ura3-52, MATa. <math>\Sigma</math>1278b.</i><br><br>Die <i>3HA-CaURA3</i> -Markierungskassette wurde mit Hilfe der Primer S3_fw_NRG2_3HA und S2_rev_NRG2_3HA aus BHUM1300 amplifiziert und chromosomal C-terminal hinter <i>NRG2</i> in YHUM1461 integriert (Knop <i>et al.</i> , 1999). Überprüft durch PCR mit den Primern fw_NRG2_Cterm und rev_NRG2_Cterm.                          | diese Arbeit               |
| YHUM1588         | <i>SMP1-3HA-CaURA3, rim101<math>\Delta</math>::loxP, ura3-52, MATa. <math>\Sigma</math>1278b.</i><br><br>Die <i>3HA-CaURA3</i> -Markierungskassette wurde mit Hilfe der Primer S3_fw_SMP1_3HA und S2_rev_SMP1_3HA aus BHUM1300 amplifiziert und chromosomal C-terminal hinter <i>SMP1</i> in YHUM1461 integriert (Knop <i>et al.</i> , 1999). Überprüft durch PCR mit den Primern fw_SMP1_Cterm und rev_SMP1_Cterm.                          | diese Arbeit               |
| YHUM1592 (WY423) | <i>P<sub>FLO11</sub>-FLO11<sup>1-30</sup>-3HA-FLO11<sup>31-Ende</sup>-TFLO11, ura3-52, his::hisG, leu2::hisG, MATa. <math>\Sigma</math>1278b.</i>  | (Guo <i>et al.</i> , 2000) |
| YHUM1593         | <i>rim101<math>\Delta</math>::loxP, sfl1<math>\Delta</math>::kanMX4, ura3-52, MATa. <math>\Sigma</math>1278b.</i><br><br>Die <i>sfl1<math>\Delta</math>::kanMX4</i> -Deletionskassette wurde mit Hilfe der Primer fw_SFL1 und rev_SFL1 aus pUG6 (BHUM0966) amplifiziert und chromosomal in YHUM1461 integriert (Güldener <i>et al.</i> , 1996). Überprüft durch eine Southern-Hybridisierung mit einer Sonde aus fw_SFL1_SP und rev_SFL1_SP. | diese Arbeit               |
| YHUM1596         | <i>rim101<math>\Delta</math>::loxP, cnb1<math>\Delta</math>::kanMX4, ura3-52, MATa. <math>\Sigma</math>1278b.</i><br><br>Die <i>cnb1<math>\Delta</math>::kanMX4</i> -Deletionskassette wurde mit Hilfe der Primer fw_CNB1 und rev_CNB1 aus pUG6 (BHUM0966) amplifiziert und chromosomal in YHUM1461 integriert (Güldener <i>et al.</i> , 1996). Überprüft durch eine Southern-Hybridisierung mit einer Sonde aus fw_CNB1_SP und rev_CNB1_SP. | diese Arbeit               |

| Stamm    | Genotyp   | Referenz                                  |
|----------|---|---|
| YHUM1602 | <i>rim101Δ::loxP, srb8Δ::kanMX4, ura3-52, MATa. Σ1278b.</i><br><br>Die <i>srb8Δ::kanMX4</i> -Deletionskassette wurde mit Hilfe der Primer fw_SRB8 und rev_SRB8 aus pUG6 (BHUM0966) amplifiziert und chromosomal in YHUM1461 integriert (Güldener <i>et al.</i> , 1996). Überprüft durch eine Southern-Hybridisierung mit einer Sonde aus fw_SRB8_SP und rev_SRB8_SP.              | diese Arbeit                              |
| YHUM1610 | <i>NRG1-3HA-kanMX6, ura3-52, MATa. Σ1278b.</i><br><br>Die <i>3HA-kanMX6</i> -Markierungskassette wurde mit Hilfe der Primer S3_fw_NRG1_3HA und S2_rev_NRG1_3HA aus BHUM1178 amplifiziert und chromosomal C-terminal hinter <i>NRG1</i> in YHUM0909 integriert (Knop <i>et al.</i> , 1999). Überprüft durch PCR mit den Primern fw_NRG1_Cterm und rev_NRG1_Cterm.                  | Stammsammlung AG<br>Mösch (Schäfer, 2009) |
| YHUM1612 | <i>NRG2-3HA- kanMX6, ura3-52, MATa. Σ1278b.</i><br><br>Die <i>3HA- kanMX6</i> -Markierungskassette wurde mit Hilfe der Primer S3_fw_NRG2_3HA und S2_rev_NRG2_3HA aus BHUM1178 amplifiziert und chromosomal C-terminal hinter <i>NRG2</i> in YHUM0909 integriert (Knop <i>et al.</i> , 1999). Überprüft durch PCR mit den Primern fw_NRG2_Cterm und rev_NRG2_Cterm.                | Stammsammlung AG<br>Mösch (Schäfer, 2009) |
| YHUM1614 | <i>SMP1-3HA- kanMX6, ura3-52, MATa. Σ1278b.</i><br><br>Die <i>3HA- kanMX6</i> -Markierungskassette wurde mit Hilfe der Primer S3_fw_SMP1_3HA und S2_rev_SMP1_3HA aus BHUM1178 amplifiziert und chromosomal C-terminal hinter <i>SMP1</i> in YHUM0909 integriert (Knop <i>et al.</i> , 1999). Überprüft durch PCR mit den Primern fw_SMP1_Cterm und rev_SMP1_Cterm.                | Stammsammlung AG<br>Mösch (Schäfer, 2009) |
| YHUM1618 | <i>NRG1-3HA- kanMX6, rim101Δ::loxP, ura3-52, MATa. Σ1278b.</i><br><br>Die <i>3HA- kanMX6</i> -Markierungskassette wurde mit Hilfe der Primer S3_fw_NRG1_3HA und S2_rev_NRG1_3HA aus BHUM1178 amplifiziert und chromosomal C-terminal hinter <i>NRG1</i> in YHUM1461 integriert (Knop <i>et al.</i> , 1999). Überprüft durch PCR mit den Primern fw_NRG1_Cterm und rev_NRG1_Cterm. | Stammsammlung AG<br>Mösch (Schäfer, 2009) |
| YHUM1620 | <i>NRG2-3HA- kanMX6, rim101Δ::loxP, ura3-52, MATa. Σ1278b.</i><br><br>Die <i>3HA- kanMX6</i> -Markierungskassette wurde mit Hilfe der Primer S3_fw_NRG2_3HA und S2_rev_NRG2_3HA aus BHUM1178 amplifiziert und chromosomal C-terminal hinter <i>NRG2</i> in YHUM1461 integriert (Knop <i>et al.</i> , 1999). Überprüft durch PCR mit den Primern fw_NRG2_Cterm und rev_NRG2_Cterm. | Stammsammlung AG<br>Mösch (Schäfer, 2009) |
| YHUM1622 | <i>SMP1-3HA- kanMX6, rim101Δ::loxP, ura3-52, MATa. Σ1278b.</i><br><br>Die <i>3HA- kanMX6</i> -Markierungskassette wurde mit Hilfe der Primer S3_fw_SMP1_3HA und S2_rev_SMP1_3HA aus BHUM1178 amplifiziert und chromosomal C-terminal hinter <i>SMP1</i> in YHUM1461 integriert (Knop <i>et al.</i> , 1999). Überprüft durch PCR mit den Primern fw_SMP1_Cterm und rev_SMP1_Cterm. | Stammsammlung AG<br>Mösch (Schäfer, 2009) |

| Stamm                | Genotyp  | Referenz     |
|----------------------|--|--------------|
| YHUM1654             | <i>rim101Δ::loxP, srb10Δ::kanMX4, ura3-52, MATa.</i><br>Σ1278b.<br><br>Die <i>srb10Δ::kanMX4</i> -Deletionskassette wurde mit Hilfe der Primer fw_SRB10 und rev_SRB10 aus pUG6 (BHUM0966) amplifiziert und chromosomal in YHUM1461 integriert (Güldener <i>et al.</i> , 1996).<br>Überprüft durch eine Southern-Hybridisierung mit einer Sonde aus fw_SRB10_SP und rev_SRB10_SP. | diese Arbeit |
| YHUM1814             | <i>rim101Δ::loxP, snf1Δ::kanMX4, ura3-52, MATa.</i><br>Σ1278b.<br><br>Die <i>snf1Δ::kanMX4</i> -Deletionskassette wurde mit Hilfe der Primer fw_SNF1 und rev_SNF1 aus pUG6 (BHUM0966) amplifiziert und chromosomal in YHUM1461 integriert (Güldener <i>et al.</i> , 1996).<br>Überprüft durch eine Southern-Hybridisierung mit einer Sonde aus fw_SNF1_SP und rev_SNF1_SP.       | diese Arbeit |
| YHUM1800<br>(Y00381) | <i>rim101Δ::kanMX4, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, MATa.</i> BY4741.   | EUROSCARF    |

### 4.2.2 Plasmide

Für Klonierungen verwendete *E. coli*-Stämme:

DH5 $\alpha$ : [F<sup>-</sup>  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK<sup>-</sup>, mK<sup>+</sup>) *phoA supE44*  $\lambda^-$  *thi*<sup>-1</sup> *gyrA96 relA1*] (BHUM0002; (Hanahan, 1983))

TOP10: [F<sup>-</sup> *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74 recA1 araD139*  $\Delta$ (*ara leu*) 7697 *galU galK rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1 nupG*] (BHUM1428; (Casadaban & Cohen, 1980))

SURE<sup>®</sup>: [e14<sup>-</sup> (McrA<sup>-</sup>)  $\Delta$ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)171 *endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5* (Kan<sup>r</sup>) *uvrC* [F<sup>'</sup> *proAB lacI<sup>q</sup>* $\Delta$ M15 Tn10 (Tetr)]]  
STRATAGENE (Amsterdam, NL)

Verwendete Plasmide:

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 15 aufgeführt. Sind außer der systematischen Benennung „BHUM“ oder „B“ weitere Bezeichnungen angegeben, beziehen sich diese auf die angegebenen Referenzen.

Tabelle 15: Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

| Plasmid                         | Genotyp/Beschreibung   | Referenz                         |
|---------------------------------|--|----------------------------------|
| B2445<br>(YCplac33)             | <i>URA3, CEN4, ARS1, pMB1ori, Amp<sup>r</sup></i>  | (Sikorski & Hieter, 1989)        |
| B2799<br>(pRS415)               | <i>LEU2, CEN6, ARSH4, f1ori, pMB1ori, Amp<sup>r</sup></i>  | (Sikorski & Hieter, 1989)        |
| BHUM0094<br>(pSH47)             | <i>GAL1::CRE, URA3, CEN, Amp<sup>r</sup></i>   | (Güldener <i>et al.</i> , 1996)  |
| BHUM0643<br>(pLG669Z $\Delta$ ) | <i>P<sub>CYC1(UAS<math>\Delta</math>)</sub>-lacZ, URA3, 2 <math>\mu</math>m, Amp<sup>r</sup></i> | (Rupp <i>et al.</i> , 1999)      |
| BHUM0778                        | <i>FLO11, URA3, CEN</i><br>7,43 kb <i>FLO11</i> -Amplifikat via <i>EcoRI/SalI</i> in YCplac33    | Stammsammlung AG Mösch           |
| BHUM0966<br>(pUG6)              | <i>loxP-kanMX-loxP, Amp<sup>r</sup></i>  | (Güldener <i>et al.</i> , 1996)  |
| BHUM1043<br>(pHVX2-MUC1)        | <i>P<sub>PGK1</sub>-FLO11<sub>var. diastaticus</sub>-T<sub>FLO11</sub>, URA3, CEN</i>            | (Volschenk <i>et al.</i> , 1997) |
| BHUM1098<br>(pKT209)            | <i>yEGFP-CaURA3, Amp<sup>r</sup></i>   | EUROSCARF (Sheff & Thorn, 2004)  |



| Plasmid                   | Genotyp/Beschreibung   | Referenz                               |
|---------------------------|--|--|
| BHUM1178<br>(pYM1)        | <i>3HA.kanMX6, Amp<sup>r</sup></i>   | (Knop <i>et al.</i> , 1999)            |
| BHUM1186                  | <i>ACT1, Amp<sup>r</sup></i><br><br>Vektor für die Herstellung einer <i>ACT1</i> -Sonde mit den Primern fw_ <i>ACT1</i> und rev_ <i>ACT1</i> .   | Stammsammlung AG<br>Mösch              |
| BHUM1300                  | <i>3HA.kanMX6, Amp<sup>r</sup></i><br><br>Die <i>CaURA3</i> -Kassette wurde mit <i>BglII</i> und <i>EcoRV</i> aus dem Vektor pKT209 (BHUM1098) geschnitten und über die gleichen Restriktionsschnittstellen in den Vektor pYM1 (BHUM1078) ligiert.   | diese Arbeit                           |
| BHUM1243<br>(pLG312n)     | <i>P<sub>CYC1</sub>-lacZ, URA3, 2 μm, Amp<sup>r</sup></i>  | (Rothfels <i>et al.</i> , 2005)        |
| BHUM1266<br>(pLG312n_2/1) | <i>P<sub>CYC1</sub>-P<sub>FLO11</sub><sup>[-421-1]</sup>-lacZ, 2 μm, Amp<sup>r</sup>, URA3</i><br><br>Die Amplifikation des PFLO11-Fragments erfolgte mit Hilfe der Primer fw_YEp24-lacZ und rev_YEp24-lacZ aus FLO11-2/1-lacZ (Rupp <i>et al.</i> , 1999). Das Promotorfragment wurde mittels homologer Rekombination in die <i>XhoI</i> geschnittene MCS des PCYC1 von pLG312n eingebracht. Überprüft durch PCR mit den Primern fw_seq_YEp24lacZ und rev_seq_YEp24lacZ.    | Stammsammlung AG<br>Mösch (Mark, 2008) |
| BHUM1267<br>(pLG312n_3/2) | <i>P<sub>CYC1</sub>-P<sub>FLO11</sub><sup>[-620-182]</sup>-lacZ, 2 μm, Amp<sup>r</sup>, URA3</i><br><br>Die Amplifikation des PFLO11-Fragments erfolgte mit Hilfe der Primer fw_YEp24-lacZ und rev_YEp24-lacZ aus FLO11-3/2-lacZ (Rupp <i>et al.</i> , 1999). Das Promotorfragment wurde mittels homologer Rekombination in die <i>XhoI</i> geschnittene MCS des PCYC1 von pLG312n eingebracht. Überprüft durch PCR mit den Primern fw_seq_YEp24lacZ und rev_seq_YEp24lacZ.  | Stammsammlung AG<br>Mösch (Mark, 2008) |
| BHUM1268<br>(pLG312n_4/3) | <i>P<sub>CYC1</sub>-P<sub>FLO11</sub><sup>[-820-381]</sup>-lacZ, 2 μm, Amp<sup>r</sup>, URA3</i><br><br>Die Amplifikation des PFLO11-Fragments erfolgte mit Hilfe der Primer fw_YEp24-lacZ und rev_YEp24-lacZ aus FLO11-4/3-lacZ (Rupp <i>et al.</i> , 1999). Das Promotorfragment wurde mittels homologer Rekombination in die <i>XhoI</i> geschnittene MCS des PCYC1 von pLG312n eingebracht. Überprüft durch PCR mit den Primern fw_seq_YEp24lacZ und rev_seq_YEp24lacZ.  | Stammsammlung AG<br>Mösch (Mark, 2008) |
| BHUM1269<br>(pLG312n_5/4) | <i>P<sub>CYC1</sub>-P<sub>FLO11</sub><sup>[-1018-591]</sup>-lacZ, 2 μm, Amp<sup>r</sup>, URA3</i><br><br>Die Amplifikation des PFLO11-Fragments erfolgte mit Hilfe der Primer fw_YEp24-lacZ und rev_YEp24-lacZ aus FLO11-5/4-lacZ (Rupp <i>et al.</i> , 1999). Das Promotorfragment wurde mittels homologer Rekombination in die <i>XhoI</i> geschnittene MCS des PCYC1 von pLG312n eingebracht. Überprüft durch PCR mit den Primern fw_seq_YEp24lacZ und rev_seq_YEp24lacZ. | Stammsammlung AG<br>Mösch (Mark, 2008) |
| BHUM1270<br>(pLG312n_5)   | <i>P<sub>CYC1</sub>-P<sub>FLO11</sub><sup>[-1018-779]</sup>-lacZ, 2 μm, Amp<sup>r</sup>, URA3</i><br><br>Die Amplifikation des PFLO11-Fragments erfolgte mit Hilfe der Primer fw_YEp24-lacZ und rev_YEp24-lacZ aus pFLO11-5 (Baus <i>et al.</i> , 2003). Das Promotorfragment wurde mittels homologer Rekombination in die <i>XhoI</i> geschnittene MCS des PCYC1 von pLG312n eingebracht. Überprüft durch PCR mit den Primern fw_seq_YEp24lacZ und rev_seq_YEp24lacZ.       | Stammsammlung AG<br>Mösch (Mark, 2008) |

| Plasmid                    | Genotyp/Beschreibung  | Referenz                               |
|----------------------------|---|--|
| BHUM1271<br>(pLG312n_6/5)  | $P_{CYC1}\text{-}P_{FLO11}^{[1220-779]}\text{-}lacZ$ , 2 $\mu\text{m}$ , $Amp^r$ , $URA3$<br><br>Die Amplifikation des PFLO11-Fragments erfolgte mit Hilfe der Primer fw_YEp24-lacZ und rev_YEp24-lacZ aus FLO11-6/5-lacZ (Rupp et al., 1999). Das Promotorfragment wurde mittels homologer Rekombination in die XhoI geschnittene MCS des PCYC1 von pLG312n eingebracht. Überprüft durch PCR mit den Primern fw_seq_YEp24lacZ und rev_seq_YEp24lacZ.   | Stammsammlung AG<br>Mösch (Mark, 2008) |
| BHUM1272<br>(pLG312n_6)    | $P_{CYC1}\text{-}P_{FLO11}^{[1220-981]}\text{-}lacZ$ , 2 $\mu\text{m}$ , $Amp^r$ , $URA3$<br><br>Die Amplifikation des PFLO11-Fragments erfolgte mit Hilfe der Primer fw_YEp24-lacZ und rev_YEp24-lacZ aus pFLO11-6 (Braus et al., 2003). Das Promotorfragment wurde mittels homologer Rekombination in die XhoI geschnittene MCS des PCYC1 von pLG312n eingebracht. Überprüft durch PCR mit den Primern fw_seq_YEp24lacZ und rev_seq_YEp24lacZ.        | Stammsammlung AG<br>Mösch (Mark, 2008) |
| BHUM1273<br>(pLG312n_7/6)  | $P_{CYC1}\text{-}P_{FLO11}^{[1421-981]}\text{-}lacZ$ , 2 $\mu\text{m}$ , $Amp^r$ , $URA3$<br><br>Die Amplifikation des PFLO11-Fragments erfolgte mit Hilfe der Primer fw_YEp24-lacZ und rev_YEp24-lacZ aus FLO11-7/6-lacZ (Rupp et al., 1999). Das Promotorfragment wurde mittels homologer Rekombination in die XhoI geschnittene MCS des PCYC1 von pLG312n eingebracht. Überprüft durch PCR mit den Primern fw_seq_YEp24lacZ und rev_seq_YEp24lacZ.   | Stammsammlung AG<br>Mösch (Mark, 2008) |
| BHUM1274<br>(pLG312n_8/7)  | $P_{CYC1}\text{-}P_{FLO11}^{[1620-1182]}\text{-}lacZ$ , 2 $\mu\text{m}$ , $Amp^r$ , $URA3$<br><br>Die Amplifikation des PFLO11-Fragments erfolgte mit Hilfe der Primer fw_YEp24-lacZ und rev_YEp24-lacZ aus FLO11-8/7-lacZ (Rupp et al., 1999). Das Promotorfragment wurde mittels homologer Rekombination in die XhoI geschnittene MCS des PCYC1 von pLG312n eingebracht. Überprüft durch PCR mit den Primern fw_seq_YEp24lacZ und rev_seq_YEp24lacZ.  | Stammsammlung AG<br>Mösch (Mark, 2008) |
| BHUM1275<br>(pLG312n_9/8)  | $P_{CYC1}\text{-}P_{FLO11}^{[1820-1381]}\text{-}lacZ$ , 2 $\mu\text{m}$ , $Amp^r$ , $URA3$<br><br>Die Amplifikation des PFLO11-Fragments erfolgte mit Hilfe der Primer fw_YEp24-lacZ und rev_YEp24-lacZ aus FLO11-9/8-lacZ (Rupp et al., 1999). Das Promotorfragment wurde mittels homologer Rekombination in die XhoI geschnittene MCS des PCYC1 von pLG312n eingebracht. Überprüft durch PCR mit den Primern fw_seq_YEp24lacZ und rev_seq_YEp24lacZ.  | Stammsammlung AG<br>Mösch (Mark, 2008) |
| BHUM1276<br>(pLG312n_9)    | $P_{CYC1}\text{-}P_{FLO11}^{[1820-1573]}\text{-}lacZ$ , 2 $\mu\text{m}$ , $Amp^r$ , $URA3$<br><br>Die Amplifikation des PFLO11-Fragments erfolgte mit Hilfe der Primer fw_YEp24-lacZ und rev_YEp24-lacZ aus pFLO11-9 (Braus et al., 2003). Das Promotorfragment wurde mittels homologer Rekombination in die XhoI geschnittene MCS des PCYC1 von pLG312n eingebracht. Überprüft durch PCR mit den Primern fw_seq_YEp24lacZ und rev_seq_YEp24lacZ.       | Stammsammlung AG<br>Mösch (Mark, 2008) |
| BHUM1277<br>(pLG312n_10/9) | $P_{CYC1}\text{-}P_{FLO11}^{[2020-1573]}\text{-}lacZ$ , 2 $\mu\text{m}$ , $Amp^r$ , $URA3$<br><br>Die Amplifikation des PFLO11-Fragments erfolgte mit Hilfe der Primer fw_YEp24-lacZ und rev_YEp24-lacZ aus FLO11-10/9-lacZ (Rupp et al., 1999). Das Promotorfragment wurde mittels homologer Rekombination in die XhoI geschnittene MCS des PCYC1 von pLG312n eingebracht. Überprüft durch PCR mit den Primern fw_seq_YEp24lacZ und rev_seq_YEp24lacZ. | Stammsammlung AG<br>Mösch (Mark, 2008) |

| Plasmid                         | Genotyp/Beschreibung  | Referenz                                  |
|---------------------------------|---|---|
| BHUM1278<br>(pLG312n_10)        | $P_{CYC1}\text{-}P_{FLO11}^{[2020-1781]}\text{-}lacZ$ , 2 $\mu$ m, $Amp^r$ , $URA3$<br><br>Die Amplifikation des PFLO11-Fragments erfolgte mit Hilfe der Primer fw_YEp24-lacZ und rev_YEp24-lacZ aus pFLO11-10 (Braus et al., 2003). Das Promotorfragment wurde mittels homologer Rekombination in die XhoI geschnittene MCS des PCYC1 von pLG312n eingebracht. Überprüft durch PCR mit den Primern fw_seq_YEp24lacZ und rev_seq_YEp24lacZ.       | Stammsammlung AG<br>Mösch (Mark, 2008)    |
| BHUM1279<br>(pLG312n_11/10)     | $P_{CYC1}\text{-}P_{FLO11}^{[2220-1781]}\text{-}lacZ$ , 2 $\mu$ m, $Amp^r$ , $URA3$<br><br>Die Amplifikation des PFLO11-Fragments erfolgte mit Hilfe der Primer fw_YEp24-lacZ und rev_YEp24-lacZ aus FLO11-11/10-lacZ (Rupp et al., 1999). Das Promotorfragment wurde mittels homologer Rekombination in die XhoI geschnittene MCS des PCYC1 von pLG312n eingebracht. Überprüft durch PCR mit den Primern fw_seq_YEp24lacZ und rev_seq_YEp24lacZ. | Stammsammlung AG<br>Mösch (Mark, 2008)    |
| BHUM1280<br>(pLG312n_12/11)     | $P_{CYC1}\text{-}P_{FLO11}^{[2420-1981]}\text{-}lacZ$ , 2 $\mu$ m, $Amp^r$ , $URA3$<br><br>Die Amplifikation des PFLO11-Fragments erfolgte mit Hilfe der Primer fw_YEp24-lacZ und rev_YEp24-lacZ aus FLO11-12/11-lacZ (Rupp et al., 1999). Das Promotorfragment wurde mittels homologer Rekombination in die XhoI geschnittene MCS des PCYC1 von pLG312n eingebracht. Überprüft durch PCR mit den Primern fw_seq_YEp24lacZ und rev_seq_YEp24lacZ. | Stammsammlung AG<br>Mösch (Mark, 2008)    |
| BHUM1281<br>(pLG312n_13/12)     | $P_{CYC1}\text{-}P_{FLO11}^{[2620-2181]}\text{-}lacZ$ , 2 $\mu$ m, $Amp^r$ , $URA3$<br><br>Die Amplifikation des PFLO11-Fragments erfolgte mit Hilfe der Primer fw_YEp24-lacZ und rev_YEp24-lacZ aus FLO11-13/12-lacZ (Rupp et al., 1999). Das Promotorfragment wurde mittels homologer Rekombination in die XhoI geschnittene MCS des PCYC1 von pLG312n eingebracht. Überprüft durch PCR mit den Primern fw_seq_YEp24lacZ und rev_seq_YEp24lacZ. | Stammsammlung AG<br>Mösch (Mark, 2008)    |
| BHUM1282<br>(pLG312n_14/13)     | $P_{CYC1}\text{-}P_{FLO11}^{[2820-2381]}\text{-}lacZ$ , 2 $\mu$ m, $Amp^r$ , $URA3$<br><br>Die Amplifikation des PFLO11-Fragments erfolgte mit Hilfe der Primer fw_YEp24-lacZ und rev_YEp24-lacZ aus FLO11-14/13-lacZ (Rupp et al., 1999). Das Promotorfragment wurde mittels homologer Rekombination in die XhoI geschnittene MCS des PCYC1 von pLG312n eingebracht. Überprüft durch PCR mit den Primern fw_seq_YEp24lacZ und rev_seq_YEp24lacZ. | Stammsammlung AG<br>Mösch (Mark, 2008)    |
| BHUM1283<br>(pLG312n_15/14)     | $P_{CYC1}\text{-}P_{FLO11}^{[2984-2581]}\text{-}lacZ$ , 2 $\mu$ m, $Amp^r$ , $URA3$<br><br>Die Amplifikation des PFLO11-Fragments erfolgte mit Hilfe der Primer fw_YEp24-lacZ und rev_YEp24-lacZ aus FLO11-15/14-lacZ (Rupp et al., 1999). Das Promotorfragment wurde mittels homologer Rekombination in die XhoI geschnittene MCS des PCYC1 von pLG312n eingebracht. Überprüft durch PCR mit den Primern fw_seq_YEp24lacZ und rev_seq_YEp24lacZ. | Stammsammlung AG<br>Mösch (Mark, 2008)    |
| BHUM1444<br>(pLG312n_FLO11-BS1) | $P_{CYC1}\text{-}P_{FLO11}^{[2737-2702]}\text{-}lacZ$ , 2 $\mu$ m, $Amp^r$ , $URA3$<br><br>PFLO11-Fragment FLO11-BS1 (aus den Oligonukleotiden 1-1n_fw und 1-1n_rev generiert) über XhoI- und degenerierte Acc65I-Restriktionsschnittstelle in den Vektor pLG312n ligiert.  | Stammsammlung AG<br>Mösch (Schäfer, 2009) |

| Plasmid                           | Genotyp/Beschreibung  | Referenz                               |
|-----------------------------------|---|--|
| BHUM1447<br>(pLG312n_FLO11-BS2)   | $P_{CYC1}\text{-}P_{FLO11}^{[2131-2085]}\text{-}lacZ$ , 2 $\mu$ m, $Amp^r$ , URA3<br>PFLO11-Fragment FLO11-BS2 (aus den Oligonukleotiden 2-1n_fw und 2-1n_rev generiert) über XhoI- und degenerierte Acc65I-Restriktionsschnittstelle in den Vektor pLG312n ligiert.  | Stammsammlung AG Mösch (Schäfer, 2009) |
| BHUM1448<br>(pLG312n_FLO11-BS3)   | $P_{CYC1}\text{-}P_{FLO11}^{[1646-1610]}\text{-}lacZ$ , 2 $\mu$ m, $Amp^r$ , URA3<br>PFLO11-Fragment FLO11-BS3 (aus den Oligonukleotiden 3-1n_fw und 3-1n_rev generiert) über XhoI- und degenerierte Acc65I-Restriktionsschnittstelle in den Vektor pLG312n ligiert.  | Stammsammlung AG Mösch (Schäfer, 2009) |
| BHUM1450<br>(pLG312n_FLO11-BS3M)  | $P_{CYC1}\text{-}P_{FLO11}^{[1646-1610]}\text{-}lacZ$ , 2 $\mu$ m, $Amp^r$ , URA3<br>PFLO11-Fragment FLO11-BS3M (aus den Oligonukleotiden 3-2n_fw und 3-2n_rev generiert) über XhoI- und degenerierte Acc65I-Restriktionsschnittstelle in den Vektor pLG312n ligiert. | Stammsammlung AG Mösch (Schäfer, 2009) |
| BHUM1452<br>(pLG312n_FLO11-BS4)   | $P_{CYC1}\text{-}P_{FLO11}^{[83-49]}\text{-}lacZ$ , 2 $\mu$ m, $Amp^r$ , URA3<br>PFLO11-Fragment FLO11-BS4 (aus den Oligonukleotiden 4-1n_fw und 4-1n_rev generiert) über XhoI- und degenerierte Acc65I-Restriktionsschnittstelle in den Vektor pLG312n ligiert.      | Stammsammlung AG Mösch (Schäfer, 2009) |
| BHUM1454<br>(pLG312n_ENA1-BS1)    | $P_{CYC1}\text{-}P_{FLO11}^{[588-551]}\text{-}lacZ$ , 2 $\mu$ m, $Amp^r$ , URA3<br>PENA1-Fragment ENA1-BS1 (aus den Oligonukleotiden 5-1_fw und 5-1n_rev generiert) über XhoI- und degenerierte Acc65I-Restriktionsschnittstelle in den Vektor pLG312n ligiert.       | Stammsammlung AG Mösch (Schäfer, 2009) |
| BHUM1542<br>(pFI1)                | 3HA-RIM101, LEU2, ADE3, pUCori, f1ori, CEN6, $Amp^r$  | (Hayashi <i>et al.</i> , 2005)         |
| BHUM1544<br>(pLG669ZΔ_FLO11-BS1)  | $P_{CYC1(UAS\Delta)}\text{-}P_{FLO11}^{[2737-2702]}\text{-}lacZ$ , 2 $\mu$ m, $Amp^r$ , URA3<br>PFLO11-Fragment FLO11-BS1 aus BHUM1444 mit flankierenden Bereichen über BamHI- und XhoI-Schnittstelle in pLG669ZΔ ligiert.  | Stammsammlung AG Mösch (Schäfer, 2009) |
| BHUM1546<br>(pLG669ZΔ_FLO11-BS2)  | $P_{CYC1(UAS\Delta)}\text{-}P_{FLO11}^{[2131-2085]}\text{-}lacZ$ , 2 $\mu$ m, $Amp^r$ , URA3<br>PFLO11-Fragment FLO11-BS1 aus BHUM1447 mit flankierenden Bereichen über BamHI- und XhoI-Schnittstelle in pLG669ZΔ ligiert.  | Stammsammlung AG Mösch (Schäfer, 2009) |
| BHUM1548<br>(pLG669ZΔ_FLO11-BS3)  | $P_{CYC1(UAS\Delta)}\text{-}P_{FLO11}^{[1646-1610]}\text{-}lacZ$ , 2 $\mu$ m, $Amp^r$ , URA3<br>PFLO11-Fragment FLO11-BS3 aus BHUM1448 mit flankierenden Bereichen über BamHI- und XhoI-Schnittstelle in pLG669ZΔ ligiert.  | Stammsammlung AG Mösch (Schäfer, 2009) |
| BHUM1550<br>(pLG669ZΔ_FLO11-BS3M) | $P_{CYC1(UAS\Delta)}\text{-}P_{FLO11}^{[1646-1610]}\text{-}lacZ$ , 2 $\mu$ m, $Amp^r$ , URA3<br>PFLO11-Fragment FLO11-BS3M aus BHUM1450 mit flankierenden Bereichen über BamHI- und XhoI-Schnittstelle in pLG669ZΔ ligiert.   | Stammsammlung AG Mösch (Schäfer, 2009) |
| BHUM1552<br>(pLG669ZΔ_FLO11-BS4)  | $P_{CYC1(UAS\Delta)}\text{-}P_{FLO11}^{[83-49]}\text{-}lacZ$ , 2 $\mu$ m, $Amp^r$ , URA3<br>PFLO11-Fragment FLO11-BS4 aus BHUM1452 mit flankierenden Bereichen über BamHI- und XhoI-Schnittstelle in pLG669ZΔ ligiert.  | Stammsammlung AG Mösch (Schäfer, 2009) |

| Plasmid                          | Genotyp/Beschreibung   | Referenz                               |
|----------------------------------|--|--|
| BHUM1554<br>(pLG669ZΔ_ENA1-BS1)  | $P_{CYC1(UAS\Delta)}-P_{FLO11}^{[588-551]}-lacZ$ , 2 $\mu$ m, $Amp^r$ , $URA3$<br>PFLO11-Fragment ENA1-BS1 aus BHUM1454 mit flankierenden Bereichen über BamHI- und XhoI-Schnittstelle in pLG669ZΔ ligiert.  | Stammsammlung AG Mösch (Schäfer, 2009) |
| BHUM1556<br>(pLG669ZΔ_leer)      | $P_{CYC1(UAS\Delta)}-P_{FLO11}-lacZ$ , 2 $\mu$ m, $Amp^r$ , $URA3$<br>Austausch der Region zwischen den Restriktionsschnittstellen BamHI- und XhoI durch die aus pLG669ZΔ (BHUM1243).  | Stammsammlung AG Mösch (Schäfer, 2009) |
| BHUM1574                         | $P_{PGK1}-FLO11-T_{FLO11}$ , , $URA3$ , $CEN$<br>Der PPGK1 wurde mit den Primern fw-PPGK1-FLO11-45 und rev-PPGK1-FLO11-45 aus pHVX2-MUC1 (BHUM1043) amplifiziert und mittels homologer Rekombination in das XbaI/Sall geschnittene Plasmid aus BHUM0778 eingebracht. Überprüft durch Sequenzierung mit den Primern fw_72-Sall-BHUM0778-9 und rev158bp_inclATG. | diese Arbeit                           |
| BHUM1628                         | $P_{FLO11-Nrg1-BM\ III\ mut.}-FLO11$ , $CEN$ , $URA3$<br>Das Nrg1-BM III im PFLO11 im Plasmid aus BHUM0778 wurde mittels „Quick-change Mutagenese“ unter Verwendung der Primer fw_FLO11_BM3mut und rev_FLO11_BM3mut mutiert. Überprüft durch Sequenzierung mit dem Primer seq_fw_BM3mut_101bp.   | diese Arbeit                           |
| BHUM1631<br>(pLG312n_FLO11-BS5)  | $P_{CYC1}-P_{FLO11}^{[2330-2295]}-lacZ$ , 2 $\mu$ m, $Amp^r$ , $URA3$<br>PFLO11-Fragment FLO11-BS5 (aus den Oligonukleotiden bs5-1_fw und bs5-1n_rev generiert) über XhoI- und degenerierte Acc65I-Restriktionsschnittstelle in den Vektor pLG312n ligiert.  | diese Arbeit                           |
| BHUM1633<br>(pLG312n_FLO11-BS6)  | $P_{CYC1}-P_{FLO11}^{[1800-1765]}-lacZ$ , 2 $\mu$ m, $Amp^r$ , $URA3$<br>PFLO11-Fragment FLO11-BS6 (aus den Oligonukleotiden bs6-1_fw und bs6-1n_rev generiert) über XhoI- und degenerierte Acc65I-Restriktionsschnittstelle in den Vektor pLG312n ligiert.  | diese Arbeit                           |
| BHUM1635<br>(pLG312n_FLO11-BS7)  | $P_{CYC1}-P_{FLO11}^{[1146-1111]}-lacZ$ , 2 $\mu$ m, $Amp^r$ , $URA3$<br>PFLO11-Fragment FLO11-BS7 (aus den Oligonukleotiden bs7-1_fw und bs7-1n_rev generiert) über XhoI- und degenerierte Acc65I-Restriktionsschnittstelle in den Vektor pLG312n ligiert.  | diese Arbeit                           |
| BHUM1637<br>(pLG312n_FLO11-BS8)  | $P_{CYC1}-P_{FLO11}^{[163-128]}-lacZ$ , 2 $\mu$ m, $Amp^r$ , $URA3$<br>PFLO11-Fragment FLO11-BS8 (aus den Oligonukleotiden bs8-1_fw und bs8-1n_rev generiert) über XhoI- und degenerierte Acc65I-Restriktionsschnittstelle in den Vektor pLG312n ligiert.  | diese Arbeit                           |
| BHUM1654<br>(pLG669ZΔ_FLO11-BS5) | $P_{CYC1(UAS\Delta)}-P_{FLO11}^{[2330-2295]}-lacZ$ , 2 $\mu$ m, $Amp^r$ , $URA3$<br>PFLO11-Fragment FLO11-BS5 aus BHUM1631 mit flankierenden Bereichen über BamHI- und XhoI-Schnittstelle in pLG669ZΔ ligiert. Überprüft durch PCR mit den Primern Seq_pLG312n_fw und Seq_pLG312n_rev.   | diese Arbeit                           |

| Plasmid                          | Genotyp/Beschreibung   | Referenz |
|----------------------------------|--|----------|
| BHUM1656<br>(pLG669ZΔ_FLO11-BS6) | $P_{CYC1(UAS\Delta)}-P_{FLO11}^{[1800-1765]}-lacZ$ , 2 $\mu m$ , $Amp^r$ , $URA3$ diese Arbeit<br>PFLO11-Fragment FLO11-BS6 aus BHUM1633 mit flankierenden Bereichen über BamHI- und XhoI-Schnittstelle in pLG669ZΔ ligiert. Überprüft durch PCR mit den Primern Seq_pLG312n_fw und Seq_pLG312n_rev. |          |
| BHUM1658<br>(pLG669ZΔ_FLO11-BS7) | $P_{CYC1(UAS\Delta)}-P_{FLO11}^{[1146-1111]}-lacZ$ , 2 $\mu m$ , $Amp^r$ , $URA3$ diese Arbeit<br>PFLO11-Fragment FLO11-BS7 aus BHUM1635 mit flankierenden Bereichen über BamHI- und XhoI-Schnittstelle in pLG669ZΔ ligiert. Überprüft durch PCR mit den Primern Seq_pLG312n_fw und Seq_pLG312n_rev. |          |
| BHUM1660<br>(pLG669ZΔ_FLO11-BS8) | $P_{CYC1(UAS\Delta)}-P_{FLO11}^{[163-128]}-lacZ$ , 2 $\mu m$ , $Amp^r$ , $URA3$ diese Arbeit<br>PFLO11-Fragment FLO11-BS8 aus BHUM1637 mit flankierenden Bereichen über BamHI- und XhoI-Schnittstelle in pLG669ZΔ ligiert. Überprüft durch PCR mit den Primern Seq_pLG312n_fw und Seq_pLG312n_rev.   |          |

### 4.2.3 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Tabelle 16: Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide

| Bezeichnung  | Verwendung             | Sequenz 5'→3'   |
|--------------|------------------------|---|
| fw_ACT1      | BHUM1186<br>ACT1-Sonde | GCT GCT TTG GTT ATT GAT AAC GG  |
| rev_ACT1     | BHUM1186<br>ACT1-Sonde | CAC TTG TGG TGA ACG ATA GAT GG  |
| fw_CNB1      | YHUM1596               | ACT CAA TGG TGA TCA GAA TCC ATA GAA GCA<br>TTT TTA TTT CTT AAA CAG CTG AAG CTT CGT ACG<br>C     |
| rev_CNB1     | YHUM1596               | TTA AAA ATA TTG GCA TAC CAT AAA TGA ATG AAG<br>TGT CCC CTA GTC GCA TAG GCC ACT AGT GGA<br>TCT G |
| fw_CNB1_SP   | YHUM1596               | GAA CTC CAT TTT TGG ATT TGG C   |
| rev_CNB1_SP  | YHUM1596               | CAG CGT GTT GAC CAG AAT ACC TAT   |
| fw_DFG16     | YHUM1455               | CTC ACA AGC ATT TTT TGT TGC GGA ACG TCT<br>TTA CGT GCA AGA TTA CAG CTG AAG CTT CGT<br>ACG C     |
| rev_DFG16    | YHUM1455               | CAG CTG TAC TTC TGC AGT TAT GTC TTT TCG<br>TCC ACT GGG CCT GCC GCA TAG GCC ACT AGT<br>GGA TCT G |
| fw_DFG16_SP  | YHUM1455               | AAA GTT TCA AGT ACC GCT CAC CTAC  |
| rev_DFG16_SP | YHUM1455               | GTA TTG TTT TTG AGC CTT CGG AG  |

| Bezeichnung   | Verwendung                                      | Sequenz 5'→3'   |
|---------------|---|---|
| fw_FLO11      | FLO11-Sonde                                     | TTG TCT CAA CCA CCG TCG TTA   |
| rev-FLO11     | FLO11-Sonde                                     | AAC TGG AAG AGC GAG TAG CAA   |
| fw_NRG1       | YHUM1459,<br>1522 & 1566                        | TTC CTC TCG ACC AGC ATA TTA CTA CCC TTC<br>GCA AAC TTT CAG GCA CAG CTG AAG CTT CGT<br>ACG C     |
| rev_NRG1      | YHUM1459,<br>1522 & 1566                        | GGA ATA GTA GTA CTG CTA ATG AGA AAA ACA<br>CGG GTA TAC CGT CAA GCA TAG GCC ACT AGT<br>GGA TCT G |
| fw_NRG1_SP    | YHUM1459,<br>1522 & 1566                        | TGT GGC AGA TAA GCC TTT CTA ATC   |
| rev_NRG1_SP   | YHUM1459,<br>1522 & 1566                        | GTA GAA AGA TGA CAC TGC CAA GAG A   |
| fw_NRG2       | YHUM1514,<br>1530, 1564,<br>1570, 1574<br>&1576 | ACT GTT CGA AGA ACA AAA AAT ATA AAG CTT<br>CTA CAA AAT TTC CAG CAG CTG AAG CTT CGT<br>ACG C     |
| rev_NRG2      | YHUM1514,<br>1530, 1564,<br>1570, 1574<br>&1576 | TAC GTT ATT TGA ATA TTT AAA TGT TTT TGG CTG<br>AGC TCA CTC ACA GCA TAG GCC ACT AGT GGA<br>TCT G |
| fw_NRG2_SP    | YHUM1514,<br>1530, 1564,<br>1570, 1574<br>&1576 | CCC GAA GCC AAG AAA AAA   |
| rev_NRG2_SP   | YHUM1514,<br>1530, 1564,<br>1570, 1574<br>&1576 | TTG GTG CCG GAA ACT CAT TT  |
| fw_RIM101     | YHUM1461 &<br>1528                              | AAA ATA CTG AAA ACG GTA AAG TAG GTT TGT<br>TTA AAT TGA CTT AAG CAG CTG AAG CTT CGT<br>ACG C     |
| rev_RIM101    | YHUM1461 &<br>1528                              | CAG CCG CAA AGA AAC AAC TAA GAA TAA AAT<br>ATC CGA CAA TCC ATA GCA TAG GCC ACT AGT<br>GGA TCT G |
| fw_RIM101_SP  | YHUM1461 &<br>1528                              | GTT TTA CCA GTC CAA GTA CCC AAA TG  |
| rev_RIM101_SP | YHUM1461 &<br>1528                              | GAG CTG CAG TCT TTA TTC GTT CA  |
| fw_SFL1       | YHUM1593  | TAA GAC AGC ACA AAT CAG TTA TAT AGA AAA<br>AAA GAA GAA AAA ATC CAG CTG AAG CTT CGT<br>ACG C     |
| rev_SFL1      | YHUM1593  | AGG TGC TTT GAA CTT TTA GAC AAC TAG AGA<br>TTA AAA AGG CAA AGA GCA TAG GCC ACT AGT<br>GGA TCT G |

| Bezeichnung     | Verwendung      | Sequenz 5'→3'   |
|-----------------|-----------------|---|
| fw_SFL1_SP      | YHUM1593        | CAT AAA GAT GCT CGG AAT CGG   |
| rev_SFL1_SP     | YHUM1593        | TTC TAA TAG CAC CAG CGG ATG   |
| fw_SMP1         | YHUM1463 & 1524 | CTC TAG ATA AGC AAA CAC AAT TAT TTT CAA AAA<br>AAT TTC TGC TAA CAG CTG AAG CTT CGT ACG C        |
| rev_SMP1        | YHUM1463 & 1524 | AAG CGA ATG CTT TCT TGT AGT AAA AAG TAG<br>CTA GAA AGC GAT TCA GCA TAG GCC ACT AGT<br>GGA TCT G |
| fw_SMP1_SP      | YHUM1463 & 1524 | GGA TCT AAT CGG CAT AAA TAT TTT CC  |
| rev_SMP1_SP     | YHUM1463 & 1524 | GAG TGC CAC TAG TTT TCT TTG ACA G   |
| fw_SNF1         | YHUM1814        | TTT TTT TTG TAA CAA GTT TTG CTA CAC TCC CTT<br>AAT AAA GTC AAC CAG CTG AAG CTT CGT ACG C        |
| rev_SNF1        | YHUM1814        | CAT AAA AAA AAG GGA ACT TCC ATA TCA TTC TTT<br>TAC GTT CCA CCA GCA TAG GCC ACT AGT GGA<br>TCT G |
| fw_SNF1_SP      | YHUM1814        | ATT TGC TTG ATT CCG GTA GCA G   |
| rev_SNF1_SP     | YHUM1814        | ACA TTG CTC CGC TAC AAA CGT   |
| fw_SRB8         | YHUM1602        | ATC GAA AGA TTA AAA AAA GGT CTA TAG AGG<br>TAA GCC AAT AAC GCG CAG CTG AAG CTT CGT<br>ACG C     |
| rev_SRB8        | YHUM1602        | GTT ATT GGT AAA TTT ATA ATT TAT CCA TTT GGA<br>TAT ATT CTG AGA GCA TAG GCC ACT AGT GGA<br>TCT G |
| fw_SRB8_SP      | YHUM1602        | TCT GCG ATT GTT CTA CGG GTT T   |
| rev_SRB8_SP     | YHUM1602        | CAG GAA GCA TTC ATC ACC ATT G   |
| fw_SRB10        | YHUM1654        | CCC AAT TGA ATT AAG GCC GCC TAG TTT TGA<br>CGG GAG GAG AGA GAA CAG CTG AAG CTT CGT<br>ACG C     |
| rev_SRB10       | YHUM1654        | AGT GCT GTG GAA TGA AAA ATT CCA AAT ATA<br>TAT AAA AAT AGA AGC GCA TAG GCC ACT AGT<br>GGA TCT G |
| fw_SRB10_SP     | YHUM1654        | AAC TGC AGA TGG GCT CTG GAC   |
| rev_SRB10_SP    | YHUM1654        | GTG CTC CCC AGA TAC TAA TGA AA  |
| S3_fw_NRG1_3HA  | YHUM1578 & 1584 | GAT AAT TGC TTG CAA CAC TAT AGA ACA CAT<br>TTG AAA AAG GGA CAA CGT ACG CTG CAG GTC<br>GAC       |
| S2_rev_NRG1_3HA | YHUM1578 & 1584 | GGA ATA GTA GTA CTG CTA ATG AGA AAA ACA<br>CGG GTA TAC CGT CAA ATC GAT GAA TTC GAG<br>CTC G     |
| fw_NRG1_Cterm   | YHUM1578 & 1584 | TCT AAT GAT GCA TAT AAT AAG ATG GC  |



| Bezeichnung       | Verwendung  | Sequenz 5'→3'  |
|-------------------|---|--|
| rev_NRG1_Cterm    | YHUM1578 & 1584                                     | CAT AAT AGC CTT GTT GCA GCA CTA C  |
| S3_fw_NRG2_3HA    | YHUM1580 & 1586                                     | GCA AAC AAG AAG AAA AGA AAC TGG AAG AGG<br>AGG GAG GCT AGC AGT CGT ACG CTG CAG GTC<br>GAC  |
| S2_rev_NRG2_3HA   | YHUM1580 & 1586                                     | TAC GTT ATT TGA ATA TTT AAA TGT TTT TGG CTG<br>AGC TCA CTC ACA ATC GAT GAA TTC GAG CTC G   |
| fw_NRG2_Cterm     | YHUM1580 & 1586                                     | AAT AAG CAA ACC GAC AAA AAC C  |
| rev_NRG2_Cterm    | YHUM1580 & 1586                                     | CCC TTC CAT CAT CAT TAC CAC TTC  |
| S3_fw_SMP1_3HA    | YHUM1582 & 1588                                     | GCT AGT TCA ACT TTG AAA TCC ACG AGT TCG<br>ACA AAC TCT CCA GAT CGT ACG CTG CAG GTC<br>GAC  |
| S2_rev_SMP1_3HA   | YHUM1582 & 1588                                     | AAG CGA ATG CTT TCT TGT AGT AAA AAG TAG<br>CTA GAA AGC GAT TCA ATC GAT GAA TTC GAG<br>CTC G  |
| fw_SMP1_Cterm     | YHUM1582 & 1588                                     | TCA CCG AAA ACG GAT GTA CAA G  |
| rev_SMP1_Cterm    | YHUM1582 & 1588                                     | TGT GAT ATA TTT GCT ATC TGG CTT  |
| fw_YEp24-lacZ     | Herstellung des $P_{FLO11}$ -URS-Sets Kapitel 2.2.6 | CGA GCG TTG GTT GGT GGA TCA AGC CCA CGC<br>GTA GGC AAT CAG GAA AGG AAA AAA TTT TTA GG<br><br>Aufbau: 40 bp homolog stromaufwärts der <i>Xho</i> I-Schnittstelle in pLG312n und 22 bp homolog zu –[706 bis 684] stromaufwärts des ATG-Startcodons von <i>lacZ</i> in pLG669ZΔ (Rupp <i>et al.</i> , 1999) |
| rev_YEp24-lacZ    | Herstellung des $P_{FLO11}$ -URS-Sets Kapitel 2.2.6 | AGT GTG TGT ATT TGT GTT TG<br><br>homolog zu –[29 bis 10] stromaufwärts des ATG-Startcodons von <i>lacZ</i> in pLG669ZΔ (Rupp <i>et al.</i> , 1999)  |
| fw_seq_YEp24lacZ  | Sequenzierung von pLG669ZΔ (BHUM0643) Konstrukten   | AAA CTC ACA AAT TAG AGC  |
| rev_seq_YEp24lacZ | Sequenzierung von pLG669ZΔ (BHUM0643) Konstrukten   | CGG GCC TCT TCG CTA TTA  |
| Seq_pLG312n_fw    | Sequenzierung von pLG312n (BHUM1243) Konstrukten    | GAT GAC CGA AGA CCA AAG C  |

| Bezeichnung     | Verwendung                                       | Sequenz 5'→3'   |
|-----------------|--|---|
| Seq_pLG312n_rev | Sequenzierung von pLG312n (BHUM1243) Konstrukten | TAT GTG TCA GCA CTA AAG TTG   |
| 1-1n_fw         | BHUM1444 (FLO11-BS1)                             | TCG AGC TCT TTC CGT GAG TTC CCC TCT TCC<br>TCT CAC TGC ACA                |
| 1-1n_rev        | BHUM1444 (FLO11-BS1)                             | GTA CTG TGC AGT GAG AGG AAG AGG GGA ACT<br>CAC GGA AAG AGC                |
| 2-1n_fw         | BHUM1447 (FLO11-BS2)                             | TCG AGA CTA GTC CTT TTT GTC CCC TAA TGT<br>ATC CCT CAT TTC ATA CCG TCG TA |
| 2-1n_rev        | BHUM1447 (FLO11-BS2)                             | GTA CTA CGA CGG TAT GAA ATG AGG GAT ACA<br>TTA GGG GAC AAA AAG GAC TAG TC |
| 3-1n_fw         | BHUM1448 (FLO11-BS3)                             | TCG AGG CTG TGC GGG AAA ACG GAC CCT AAC<br>ACG AAT GTG AAT A              |
| 3-1n_rev        | BHUM1448 (FLO11-BS3)                             | GTA CTA TTC ACA TTC GTG TTA GGG TCC GTT<br>TTC CCG CAC AGC C              |
| 3-2n_fw         | BHUM1450 (FLO11-BS3M)                            | TCG AGG CTG TGC GGG AAA ACG GAT TCT AAC<br>ACG AAT GTG AAT A              |
| 3-2n_rev        | BHUM1450 (FLO11-BS3M)                            | GTA CTA TTC ACA TTC GTG TTA GAA TCC GTT TTC<br>CCG CAC AGC C              |
| 4-1n_fw         | BHUM1452 (FLO11-BS4)                             | TCG AGT TCA TCA GTT ATT ATC CCT CGT CAT GTT<br>GTG GTT CA                 |
| 4-1n_rev        | BHUM1452 (FLO11-BS4)                             | GTA CTG AAC CAC AAC ATG ACG AGG GAT AAT<br>AAC TGA TGA AC                 |
| 5-1n_fw         | BHUM1454 (ENA1-BS1)                              | TCG AGG TTA CAT TGT GAG TAC AGG GTC TTA<br>AAC ATC GCC GTG CA             |
| 5-1n_rev        | BHUM1454 (ENA1-BS1)                              | GTA CTG CAC GGC GAT GTT TAA GAC CCT GTA<br>CTC ACA ATG TAA CC             |
| bs5-1_fw        | BHUM1631 (FLO11-BS5)                             | TCG AGT ACA GTT GAG CAT CTC AGG GCC AGC<br>GAC AAA TAT AAA                |
| bs5-1_rev       | BHUM1631 (FLO11-BS5)                             | GTA CTT TAT ATT TGT CGC TGG CCC TGA GAT<br>GCT CAA CTG TAC                |
| bs6-1_fw        | BHUM1633 (FLO11-BS6)                             | TCG AGA CCA CCC CAA AAC GGT CCC TTG CAT<br>GCA TTG AGG TCA                |
| bs6-1_rev       | BHUM1633 (FLO11-BS6)                             | GTA CTG ACC TCA ATG CAT GCA AGG GAC CGT<br>TTT GGG GTG GTC                |
| bs7-1_fw        | BHUM1635 (FLO11-BS7)                             | TCG AGT ATT TCC CTA TCG AAG TGG GTC CTT<br>TTT GTC TTT AGA                |
| bs7-1_rev       | BHUM1635 (FLO11-BS7)                             | GTA CTC TAA AGA CAA AAA GGA CCC ACT TCG<br>ATA GGG AAA TAC                |

| Bezeichnung           | Verwendung                | Sequenz 5'→3'  |
|-----------------------|---------------------------|--|
| bs8-1_fw              | BHUM1637<br>(FLO11-BS8)   | TCG AGC AGT ACA AGT TGT TGA AGG GTT CCC<br>AAT TGA TAA AAA   |
| bs8-1_rev             | BHUM1637<br>(FLO11-BS8)   | GTA CTT TTT ATC AAT TGG GAA CCC TTC AAC<br>AAC TTG TAC TGC   |
| fw-pPGK1-FLO11-45     | BHUM1043                  | AGC TAT GAC CAT GAT TAC GCC AAG CTT GCA<br>TGC CTG CAG GTC GAC ATC TTG TTT TGC AAG<br>TAC CAC<br><br>Aufbau: 45 bp homolog stromaufwärts der <i>Sall</i> -Schnittstelle (inkl.) im Plasmid aus BHUM0779 und 21 bp homolog vor dem <i>P<sub>PGK1</sub></i> -Bereich in pHVX2-MUC1 |
| rev-pPGK1-FLO11-45    | BHUM1043                  | AAA TAG AAG CGA AAG GAC CAA ATA AGC GAA<br>TGG AAA TGG TCT TTG CAT TGT TTT ATA TTT GTT<br>GTA AAA AGT A<br><br>Aufbau: 45 bp stromabwärts <i>FLO11</i> (inkl. ATG) im Plasmid aus BHUM0779 und 25 bp homolog stromaufwärts des <i>P<sub>PGK1</sub></i> (exkl. ATG) in pHVX2-MUC1 |
| fw_72-Sall-BHUM0778-9 | Sequenzierung<br>BHUM1574 | TTG TGA GCG GAT AAC AAT TTC  |
| rev158bp_inclATG      | Sequenzierung<br>BHUM1574 | ATG TGC CAA TTG AAG TCT AAG TTG G  |
| fw_FLO11_BM3mut       | BHUM1628                  | GTG CGG GAA AAC GGA TTC TAA CAC GAA TGT G  |
| rev_FLO11_BM3mut      | BHUM1628                  | CAC ATT CGT GTT AGA ATC CGT TTT CCC GCA C  |
| seq_fw_BM3mut_101 bp  | Sequenzierung<br>BHUM1628 | GTC ATG CAC CTG CAG TACT   |

## 5 Methoden

### 5.1 Kultivierung der Mikroorganismen

#### 5.1.1 Kultivierung von *E. coli*

*E. coli* wurde in LB-Medium (Tabelle 10) bei 37 °C auf einem Rotationsschüttler über Nacht kultiviert. Das Festmedium enthielt 2 % (w/v) Agar. Zur Selektion auf Plasmide wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben.

SOC-Medium für die Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen wurde nach Inoue *et al.* (1990) hergestellt.

Das Wachstum der *E. coli*-Zellen wurde durch Messung der Optischen Dichte (OD) bei 600 nm gegen das verwendete Medium bestimmt. Dabei entspricht eine  $OD_{600} = 1$  einer Zelldichte von ca.  $2 \cdot 10^8$  Zellen/ml (Sherman *et al.*, 1986). Wachstumszeiten und Volumina wurden nach folgender Formel bestimmt:

$$v_i = \frac{v_c \times OD_t}{OD_p} \times e^{\mu \Delta t}$$

$v_i$  = Impfvolumen (ml)

$OD_p$  = OD der Primärkultur

$v_c$  = Volumen der Kultur (ml)

$\mu$  = Wachstumsrate ( $h^{-1}$ )

$OD_t$  = gewünschte OD nach der Zeit  $t$

$\Delta t$  = Wachstumsrate (h)

#### 5.1.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

*S. cerevisiae* wurde, sofern nicht anders angegeben, in synthetischem Minimalmedium YNB (Tabelle 10) oder zum Wachstum in einem bestimmten pH-Bereich in YNB-Medium, das 0,25 M HEPES beinhaltete und nach pH 4,5, pH 7 und pH 8 titriert wurde bei 30 °C auf einem Dreh- oder Rotationsschüttler kultiviert (Herstellung des gepufferten YNB-Mediums ist im Folgenden beschrieben).

Als weitere Flüssigmedien wurden das Vollmedium YPD oder das synthetische Komplexmedium SC (YNB + Aminosäuremischung) verwendet. Als Kohlenstoff-Quelle wurde dem YNB- und SC-Medium 2 % (w/v) Glucose oder 2 % (w/v) Galaktose zugesetzt (Tabelle 10). Supplemente (L-Histidin, L-Leucin, L-Tryptophan und Uracil) wurden in Abhängigkeit des verwendeten Stammhintergrundes zugegeben (Sherman *et*

*al.*, 1986). Das Vollmedium YPG wurde für die Induktion der Cre-Rekombinase verwendet. Für feste Medien wurde 2 % (w/v) Agar hinzugesetzt. Geneticin-G418 (CARL ROTH GmbH & Co. KG) wurde in einer Endkonzentration von 200 µg/ml verwendet (Tabelle 9).

Bei Mediumwechsel wurden die Hefezellen, wenn nicht anders angegeben, für 5 min bei 3.000 UpM abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zell-Pellet in neuem Medium aufgenommen.

Das Wachstum der Hefezellen wurde durch Messung der OD<sub>600</sub> gegen das verwendete Medium bestimmt. Dabei entspricht eine OD<sub>600</sub> = 1 einer Zelldichte von ca.  $1,5 \cdot 10^7$  Zellen/ml (Sherman *et al.*, 1986). Wachstumszeiten und Volumina wurden durch die in Kapitel 5.1.1 angegebene Formel bestimmt.

#### *Herstellung gepufferten YNB-Mediums:*

Es wurden 3 l YNB-Medium mit 25 mM Hepes angesetzt und auf pH 8 titriert. Unter diesen Bedingungen präzipitieren bei Raumtemperatur nicht näher definierte Mediums-Bestandteile und fallen aus. Für eine definierte Fällung wurde das angesetzte Medium über Nacht (mind. 8 h) bei 4 °C gelagert und am nächsten Tag sterilfiltriert. Im Anschluss wurde das Medium auf 30 °C gebracht (30 °C Raum) und in 3x 1 l Aliquots aufgeteilt, die auf pH 4,5, pH 7 und pH 8 (mit 1 M und 6 M HCl-Lsg. bzw. 1 M und 5 M NaOH-Lsg.) eingestellt und steril filtriert wurden.

## **5.2 Isolierung und Manipulation von DNA**

### **5.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* mit Hilfe eines „Mini-Präp-Kits“**

Die Anzucht entsprechender *E. coli*-Klone erfolgte über Nacht bei 37 °C in 5 ml Selektivmedium auf einem Rotationsschüttler. Die Präparation erfolgte nach Protokoll des „QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit“ (QIAGEN GmbH) nach Angaben des Herstellers. Die Plasmid-DNA wurde in 50 µl Elutionspuffer für Klonierungszwecke oder in 50 µl „HiPerSolv Chromanorm H<sub>2</sub>O“ (VWR International GmbH) für die Sequenzierung bzw. Restriktion aufgenommen und die Konzentration der DNA-Lösung wurde photometrisch bei 260 nm mit dem „NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 Spectrophotometer“

(FISHER SCIENTIFIC GmbH) bestimmt. Die DNA-Lösung wurde bei -20 °C aufbewahrt.

### **5.2.2 Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* (Birnboim & Doly, 1979)**

Die Anzucht des gewünschten *E. coli*-Stamms erfolgte in 5 ml Selektivmedium über Nacht. 1,5 ml Übernachtskultur wurden 1 min bei 13.000 UpM zentrifugiert und das Pellet in 100 µl Lösung 1 resuspendiert. Die Lysis der Zellen erfolgte durch Zugabe von 200 µl Lösung 2, wobei das Reaktionsgefäß kurz invertiert wurde. Der maximal 5-minütigen Inkubation auf Eis folgte die Zugabe von 250 µl Lösung 3 zur Neutralisation des Ansatzes, gefolgt von einer weiteren 5-minütigen Inkubation auf Eis. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 13.000 UpM und 4 °C zur Abtrennung chromosomaler DNA und denaturierter Proteine wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 5 µl RNase A (10 mg/ml) (METABION INTERNATIONAL AG) hinzugegeben und der Ansatz für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Entfernung von Proteinresten aus der Lösung erfolgte anschließend durch Zugabe von 1 Volumen TE-gesättigter „Roti<sup>®</sup>-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung“ im Verhältnis 25 : 24 : 1 (CARL ROTH GmbH & Co. KG), gefolgt von einer 10-minütigen Zentrifugation bei 13.000 UpM. Zur Fällung der DNA aus der wässrigen Phase wurde im Anschluss 1 Volumen eiskaltes EtOH zugegeben und das Gemisch für 20 min bei -20 °C inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation für 10 min bei 13.000 UpM wurde das entstandene Pellet luftgetrocknet und in 50 µl „HiPerSolv Chromanorm H<sub>2</sub>O“ (VWR International GmbH) aufgenommen.

### **5.2.3 Isolierung von Gesamt-DNA aus *S. cerevisiae*: „Smash & Grab“ (Hoffman & Winston, 1987)**

10 ml Hefekultur wurden in YPD über Nacht bei 30 °C angezogen. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation für 5 min bei 4.000 UpM. Die Zelle wurden mit 500 µl H<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend in 200 µl Lysierungspuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Glasperlen (Ø 0,25-0,50 mm) und 200 µl einer TE-gesättigten Roti<sup>®</sup>-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (Verhältnis 25 : 24 : 1) (CARL ROTH GmbH & Co. KG) wurden die Zellen durch 10-minütiges Schütteln auf einem

„Vibrax Basic“ (IKA) bei 4 °C aufgebrochen. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 13.000 UpM für 10 min, nach dem die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Nach Vermischung mit 1 ml 100%igen eiskaltem EtOH wurde die Lösung für 10 min bei -20 °C inkubiert und dann 10 min bei 13.000 UpM abzentrifugiert. Das Pellet wurde getrocknet, in 400 µl ddH<sub>2</sub>O mit 5 µl RNase A (10 mg/ml) (METABION INTERNATIONAL AG) gelöst und 5 min bei 37 °C inkubiert. Nach einer weiteren Fällung durch 1 ml eiskaltes 100%iges EtOH und Zentrifugation bei 13.000 UpM für 5 min wurde das luftgetrocknete Pellet in 50 µl „HiPerSolv Chromanorm H<sub>2</sub>O“ (VWR International GmbH) oder dem entsprechenden Volumen TE-Puffer aufgenommen. In dieser Form wurde die DNA bei -20 °C aufbewahrt und als Matrize für PCR eingesetzt oder für die Restriktion verwendet.

#### 5.2.4 Polymerase-Kettenreaktion „PCR“ (modifiziert nach Saiki *et al.*, 1985)

Für die Polymerase-Kettenreaktion wurden die thermostabilen Enzyme KOD-DNA-Polymerase (NOVAGEN), *Taq*-DNA-Polymerase (METABION INTERNATIONAL AG) und „Phusion<sup>TM</sup> High-Fidelity“-DNA-Polymerase (FINNZYMES) verwendet. Üblicherweise wurden für einen 1-fachen Reaktionsansatz 5 µl 10x PCR-Puffer, 1 µl dNTPs (jeweils 10 mM), 1 µl jedes Oligonukleotids (auf 20 mM verdünnt), 1 µl Matrizen-DNA (~100 ng), 1 µl Polymerase und 40 µl „HiPerSolv Chromanorm H<sub>2</sub>O“ (VWR International GmbH) verwendet bzw. das Protokoll entsprechend den Angaben des Herstellers angepasst. Die Art und Dauer des Temperaturprofils richtete sich nach den Angaben der Hersteller, den verwendeten Oligonukleotiden und der Matrize und wurde entweder in einem PCR-Block „Primus 25 advanced“ oder „Primus 96 advanced“ (PEQLAB BIOTECHNOLOGIE GmbH) ausgeführt:

1. 94 °C – 98 °C     2 min    initiale Denaturierung
2. 94 °C – 98 °C     15 s     Denaturierung
3. 50 °C – 60 °C     30 s     Hybridisierung
4. 68 °C – 72 °C     0,5-7 min Elongation
5. 68 °C – 72 °C     5 min finale Elongation

Die Schritte 2. – 4. wurden hierbei 30x wiederholt.

### 5.2.5 Sequenzspezifische Mutagenese (Quick-Change Mutagenese)

Zur Einbringung einer Punktmutation in ein Plasmid wurde das Quickchange Site-Directed Mutagenesis-Protokoll von STRATAGENE eingesetzt. Dafür wurden zwei revers-komplementäre Oligonukleotide verwendet, die zwischen zwei je 12 bp langen Regionen das gewünschte Codon trugen. Mithilfe dieser Oligonukleotide wurde das gesamte Plasmid – samt der einzubringenden Mutation – dupliziert. Durch eine Restriktion mit *DpnI* wurden die methylierten paternalen Plasmide abgebaut. Der so erhaltene Ansatz wurde in elektrokompente *E. coli* transformiert und die bei der PCR entstandenen freien DNA-Enden *in vivo* verknüpft. Für diese PCR wurde die „Phusion<sup>TM</sup> High-Fidelity“-DNA-Polymerase (FINNZYMES) verwendet. Es wurden 50 µl Reaktionsansätze angesetzt, die 1 µl Matrizen-DNA, 2 µl dNTPs (jeweils 10 mM), 1 µl Oligonukleotide (25 mM), 0,5 µl Polymerase, 2 µl MgCl<sub>2</sub>, 10 µl 5x HF-Puffer, 32,5 µl „HiPerSolv Chromanorm H<sub>2</sub>O“ (VWR International GmbH) beinhalten.

Das PCR-Programm wurde wie folgt angepasst:

1. 98 °C      2 min    initiale Denaturierung
2. 98 °C      15 s     Denaturierung
3. 55 °C      30 s     Hybridisierung
4. 72 °C      3,5 min   Elongation
5. 72 °C      5 min    finale Elongation

Die Schritte 2.- 4. wurden hierbei 35-mal wiederholt.

### 5.2.6 Restriktion von DNA

Zur Restriktionsenzymatischen Spaltung doppelsträngiger DNA wurden verschiedene DNA-Endonukleasen und korrespondierende Puffersysteme der Firmen FERMENTAS GmbH und NEW ENGLAND BIOLABS Inc. verwendet. Die Pufferbedingungen wurden nach Angaben des Herstellers gewählt und bei Doppelverdauen wurde auf die Pufferkompatibilitätstabellen des jeweiligen Herstellers zurückgegriffen. Für analytische Restriktionsreaktionen wurden ~0,5 µg DNA mit 1-2 Units Restriktionsenzym in einem Volumen von 20 µl für 2-3 h oder über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für die Restriktion präparativer DNA-Mengen wurden die Ansätze



entsprechend angepasst. Restriktionen mit mehreren Enzymen wurden wahlweise zusammen oder sequenziell durchgeführt. Die Inaktivierung der Restriktionsenzyme erfolgte durch Hitze für 20 min bei 65 °C oder 80 °C und führte so zum Abstoppen der Reaktion.

### 5.2.7 Zusammenlagerung einzelsträngiger DNA-Fragmente

Um doppelsträngige DNA für Klonierungszwecke zu erhalten, wurden synthetische Oligonukleotide (METABION INTERNATIONAL AG) verwendet. Je 1 µmol der vorwärts- und rückwärts-orientierten Oligonukleotide wurden zusammen mit einem Reaktionspuffer (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0) in einem Gesamtvolumen von 400 µl eingesetzt. Der Ansatz wurde für 15 min bei 95 °C in einem Heizblock erhitzt und anschließend im deaktivierten Heizblock auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Lösung wurde bei -20 °C aufbewahrt. Die so hergestellten DNA-Fragmente wurden anschließend für die Klonierung verwendet und waren so angelegt, dass nach der Zusammenlagerung überhängende Enden mit einer *Xho*I und degenerierten *Acc*65I (5'-G<sup>^</sup>GTACC-3' → 5'AGTACC-3') entstehen. Für die späteren Ligationsreaktionen wurden die DNA-Fragmente auf 10 nmol/µl verdünnt.

### 5.2.8 Dephosphorylierung und Ligation von DNA

Für die Dephosphorylierung der 5'-Enden linearisierten DNA-Fragmente wurde die DNA direkt im Anschluss an den Restriktionsverdau mit „Alkalische Phosphatase - Shrimp; Cat. No. 1 758 250“ (ROCHE GmbH) in dem vorgesehenen Puffer für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch Erhitzen auf 65 °C für 15 min.

### 5.2.9 Phosphorylierung von DNA-Fragmenten

Die zusammengelagerten synthetischen Oligonukleotide (vgl. Kapitel 5.2.7) trugen keine 5'-Phosphatgruppe. Daher musste die γ-ständige Phosphatgruppe eines ATPs für weitere Klonierungsschritte mit dem freien 5'-Hydroxyl verestert werden. Die DNA-

Fragmente wurden dazu in einem Phosphorylierungsansatz mit T4-Polnukleotidkinase (FERMENTAS GmbH), Reaktionspuffer und ATP nach Herstellerangaben inkubiert.

#### **5.2.10 Ligation von DNA (modifiziert nach Maniatis *et al.*, 1982 )**

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte in einem 20 µl Reaktionsansatz mit Ligationspuffer durch 5 U T4-DNA-Ligase (FERMENTAS GmbH). Die überhängenden DNA-Enden wurden durch Inkubation der Reaktion für 2 h bei Raumtemperatur oder für 8 h bei 16 °C verbunden. Die Konzentration der DNA betrug 1-10 µg/ml, wobei das Verhältnis von Vektor- zu Insert-DNA zwischen 1:5 und 1:10 lag. Die Ligrationsreaktion wurde durch 10-minütiges Erhitzen auf 65 °C gestoppt und der Ansatz ohne weitere Aufreinigung zur Transformation eingesetzt. Für die Transformation elektrokompenter *E. coli*-Stämme durch Elektroporation erfolgte eine Dialyse des Ligrationsprodukts.

#### **5.2.11 *S. cerevisiae* in vivo-Ligation (modifiziert nach Jansen *et al.*, 2005)**

Ein linearisierter Vektor und ein DNA-Insert, deren Enden jeweils homolog zueinander waren, wurden zusammen in *S. cerevisiae* transformiert. Das Insert wurde dabei durch homologe Rekombination *in vivo* in den Vektor eingefügt. Die homologen Bereiche umfassten hierbei jeweils 45 bp. Das gewünschte Insert wurde mittels PCR und geeigneten Oligonukleotiden amplifiziert. Die verwendeten Oligonukleotide beinhalten am 5'-Ende eine 45 bp große Homologie zur Zielregion im Vektor und am 3'-Ende eine etwa 21-25 bp große Homologie zur Matrizen-DNA für eine gewöhnliche PCR. Der Vektor wurde mit Endonukleasen derart geschnitten, dass ein Teil der zu ersetzenden Region zu großen Teilen entfernt wurde und die homologen Regionen möglichst an den Enden des linearisierten Vektors lagen. Sowohl 10 µl Insert als auch linearisierter Vektor wurden in *S. cerevisiae* transformiert. Die gewonnenen Transformanten wurden geerntet, ihre DNA isoliert und in elektrokompente *E. coli*-Zellen transformiert.

### 5.2.12 Mikrodialyse von DNA-Lösungen (Marusyk & Sergeant, 1980)

Mit Hilfe der Mikrodialyse wurden die Ligationsansätze entsalzt und konnten so für die *E. coli*-Transformation mittels Elektroporation verwendet werden. Hierfür wurde in eine sterile Petrischale steriles dH<sub>2</sub>O gefüllt und der Membranfilter (Porengröße 0,025 µm) (MILIPORE GmbH) mit der glänzenden Seite nach oben auf die Flüssigkeitsoberfläche gelegt. Die zu entsalzende DNA wurde auf den Membranfilter pipettiert und nach 30 min wieder abgenommen.

### 5.2.13 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte nach Größe in 1-1,5%igen Agarosegelen, die mit TAE-Puffer angesetzt wurden. Zur DNA-Lösung wurden ~0,15 Volumen DNA-Ladepuffer zugegeben. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 90 V und automatisch angepasster Stromstärke für 45-60 min. Unter den angelegten Bedingungen wurde hierbei eine Leistung von etwa 300 W abgerufen. Als Größenstandard wurde „GeneRuler™ DNA Ladder Mix“ (FERMENTAS GmbH) verwendet. Zur Detektion der DNA-Banden wurden die Agarosegele für 10 min 0,5 µg/ml Ethidiumbromid-Lösung inkubiert und daran anschließend für 10 min in einem Wasserbad entfärbt. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm mit einem GelDoc XR System und der Software Quantity One 1-D (BIO-RAD LABORATORIES GmbH).

### 5.2.14 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Verwendung geschnittener DNA-Fragmente in weiteren Reaktionen wurden diese aus dem Agarosegel unter UV-Licht ( $\lambda = 366$  nm) mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die weitere Extraktion erfolgte unter Verwendung und nach Protokoll des „QIAquick® Gel Extraction Kit“ (QIAGEN GmbH). Die extrahierte DNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

### 5.2.15 Herstellung von DNA-Sonden für die Southern- und Northern-Hybridisierung

Die Amplifikation DIG-gelabelter Sonden für die Northern- und Southern-Analyse erfolgte unter Verwendung des „PCR DIG Labeling Mix; Cat. No. 11 585 550 910“ (ROCHE GmbH) nach der Anleitung des Herstellers, wobei die Art und Dauer des Temperaturprofils an die verwendeten Oligonukleotide und verwendete DNA-Matrize angepasst wurde.

Die Amplifikation einer DIG-gelabelten *ACT1*-Sonde (1106 bp) für die Northern-Analyse erfolgte unter Verwendung der Primer fw\_ACT1 und rev\_ACT1 aus dem Plasmid in BHUM1186. Für eine *FLO11*-Sonde (974 bp) wurde mit den Primern fw\_FLO11 und rev\_FLO11 ein DNA-Fragment aus dem Plasmid in BHUM0778 amplifiziert.

DIG-gelabelte Sonden für die Southern-Analyse wurden ebenfalls mittels PCR, aus „Smash & Grab“-DNA eines Wildtypstamms (YHUM0909) als Matrize hergestellt. Verwendet wurden die jeweils angegebenen Primer-Kombinationen.

## 5.3 Transformationsmethoden

### 5.3.1 Transformation chemisch kompetenter *E. coli* „SOC-Methode“ (modifiziert nach Mandel & Higa, 1970)

*Herstellung chemisch kompetenter E. coli-Zellen:*

Ein 1 l-Kolben mit 250 ml SOB-Medium wurde mit *E. coli* angeimpft (wenige Kolonien) und bei 18 °C bei 200 UpM bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 inkubiert (~24 h). Zum Ernten wurden die Zellen zunächst 10 min auf Eis gekühlt und anschließend für 10 min bei 5.000 UpM bei 4 °C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert, für 10 min bei 5.000 UpM auf Eis inkubiert und zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Zellen in 20 ml TB-Puffer aufgenommen und vorsichtig resuspendiert, bevor der Ansatz mit Dimethylsulfoxid bis zu einer Endkonzentration von 7% (w/v) versetzt wurde. Nach einer vorsichtigen Durchmischung folgte ein weiterer 10-minütiger Inkubationsschritt auf Eis.

Abschließend wurde der Ansatz aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

*Transformation chemisch kompetenter E. coli-Zellen:*

Die kryokonservierten *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Je 100 µl kompetente Zellen wurden mit der entsprechenden Menge DNA (1 µl Vektor bzw. 8 µl „Smash & Grab“ DNA) für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem 45-sekündigen Hitzeschock bei 42 °C wurden 800 µl SOC-Medium (ohne Antibiotikum) zum Transformationsansatz gegeben und die Kultur zur Erholung für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen auf Selektivmedium ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### **5.3.2 Transformation elektrokompenter *E. coli* (modifiziert nach Dower *et al.*, 1988)**

*Herstellung elektrokompenter E. coli-Zellen:*

200 ml LB-Medium (selektiv) wurden mit 5 ml einer über Nacht gewachsenen Vorkultur versetzt und nach ~4 h Schüttelinkubation bei 37 °C bei einer OD<sub>600</sub> ~0,8 auf vier 50 ml Reaktionsgefäße (SARSTEDT AG & Co.) aufgeteilt und für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen durch 5-minütige Zentrifugation (5.000 UpM, bei 4 °C) geerntet. Es folgten zwei Waschschrte mit eiskaltem, sterilem H<sub>2</sub>O (1x 50 ml; 1x30 ml), wonach die Zellpellets in jeweils 5 ml eiskalter 10%iger Glycerinlösung aufgenommen und in einem 50 ml Reaktionsgefäß (SARSTEDT AG & Co.) vereinigt wurden. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation (5.000 UpM, bei 4 °C) wurde das Pellet in 400 µl eiskalter Glycerinlösung aufgenommen und die Suspension in 50 µl-Aliquots aufgeteilt. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -80 °C.

*Transformation elektrokompenter E. coli-Zellen:*

Für die Transformation wurde ein Aliquot elektrokompenter Zellen auf Eis aufgetaut, mit 2 µl Plasmid DNA oder 8 µl Ligationsansatz gemischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (1 mm Spaltbreite) überführt. Der elektrische Puls wurde mit einem Gene Pulser<sup>TM</sup> (BIO-RAD LABORATORIES GmbH) bei einer Spannung von 2,15 kV, einem Widerstand von 200 Ω und einer Kapazität von 25 µFD gegeben. Die Zeitkonstante  $\tau$  des Impulses sollte zwischen 4,6 und 4,8 ms liegen. Nach der

Elektroporation wurde unmittelbar 1 ml kaltes LB-Medium zugegeben und die Kultur zur Erholung für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen pelettiert (3 min, 5.000 UpM), der Überstand verworfen und die in Restflüssigkeit aufgenommenen Zellen auf Selektivmedium ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 5.3.3 Transformation von *S. cerevisiae* (modifiziert nach Knop *et al.*, 1999)

#### *Herstellung kompetenter S. cerevisiae-Zellen:*

Die Transformation von *S. cerevisiae* erfolgte nach der LiOAc-Methode. Der verwendete Hefestamm wurde in YPD über Nacht auf einem Schüttler bei 30 °C angezogen. Aus dieser Übernachtskultur wurde eine Hauptkultur auf OD<sub>600</sub> = 0,2 angeimpft und nach ~6 h Inkubation in der logarithmischen Wachstumsphase bei einer OD<sub>600</sub> ~0,7 in einem 50 ml Reaktionsgefäß (SARSTEDT AG & Co.) 3 min bei 2.000 UpM pelettiert. Die Zellen wurden danach mit 15 ml sterilem Wasser und anschließend mit 10 ml LiSORB durch leichtes Vortexen gewaschen. Das gewonnene Pellet wurde in 360 µl LiSORB gelöst und 40 µl (ss) DNA (Lachsspermien-DNA, 10 min bei 100 °C denaturiert und abgekühlt) zugegeben. Die Zellen wurden zu 50 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert oder direkt für die Transformation verwendet.

#### *Transformation kompetenter S. cerevisiae-Zellen:*

Für die Transformation wurde ein Aliquot kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut und 5 µl Plasmid DNA bzw. 50 µl PCR-Ansatz zugegeben sowie das 6-fache Volumen LiPEG hinzugegeben. Danach wurde der Ansatz vermischt und für 30 min bei 30 °C ruhend inkubiert. Nach einem 15-minütigen Hitzeschock bei 42 °C wurden die so behandelten Zellen 3 min bei 2.000 UpM pelettiert und mit 1 ml YPD gewaschen. Nach einer erneuten Aufnahme in 1 ml YPD wurden die Zellen für 1 h (bei der Selektion auf Auxotrophie-Komplementation) oder 4-6 h (Selektion auf Antibiotika-Resistenz) bei 30 °C zur Erholung geschüttelt. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen pelettiert (2.000 UpM, 3 min), der Überstand verworfen, die Zellen in Restflüssigkeit (~120 µl) aufgenommen, auf Selektivmedium ausplattiert und für 3-4 Tage bei 30 °C inkubiert.

### 5.3.4 Generierung von Gendeletionen (Güldener *et al.*, 1996)

Die in *S. cerevisiae* erzeugten Gendeletionen wurden mit Hilfe des *loxP*-Systems eingebracht. Hierfür wurde mit PCR und den angegebenen Primern eine *loxP-kanMX4-loxP* Kasette aus dem Plasmid pUG6 (BHUM0966) amplifiziert, die an ihren Enden eine 45 bp große Homologie zu den Sequenzen rechts und links des zu deletierenden Gens trägt. Das mit 1 ml 100%igem Ethanol und 5 µl 5 M Kaliumacetat gefällte PCR-Produkt wurde in 30 µl „HiPerSolv Chromanorm H<sub>2</sub>O“ (VWR International GmbH) aufgenommen und in den entsprechenden Hefestamm transformiert, wo das zu deletierende Gen per homologer Rekombination durch die Deletionskasette ersetzt wurde. Die Überprüfung der gewonnenen Transformanten auf eine erfolgreiche Deletion des gewünschten Gens erfolgte mittels „Southern-Analyse“ unter Verwendung spezifischer Sonden für das jeweils deletierte Gen. Die *kanMX4*-Resistenzkasette konnte durch Expression der Cre-Rekombinase von dem Plasmid pSH47 (BHUM0094) in den jeweiligen Stämmen wieder entfernt werden, wobei gegen die Zellen selektiert wurde, die noch eine G418-Resistenz besitzen.

## 5.4 Analyse von DNA

### 5.4.1 Nachweis von DNA „Southern-Analyse“ (Southern, 1975)

Die Southern-Analyse wurde zum Nachweis einer erfolgreichen Gendeletion verwendet. Hierfür wurde die Gesamt-DNA des zu untersuchenden Hefestamms und eines Kontrollstamms isoliert und einem Restriktionsverdau mit einem geeigneten Enzym unterzogen. Im Bereich der Gendeletion wurden so im Deletions- und Kontrollstamm unterschiedlich große DNA-Fragmente erzeugt.

#### 5.4.1.1 Gelelektrophoretische Auftrennung der DNA

Die restriktionsenzymatisch gespaltene Gesamt-DNA wurde wie in Kapitel 5.2.13 beschrieben in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, bis die untere Bromphenolblau-Bande etwa 4/5 des Gels erreicht hatte, Ethidiumbromid gefärbt und fotografiert. Im Anschluss wurde das Gel durch mehrere Waschschrte für den anschließenden Transfer der DNA auf eine Nylonmembran vorbereitet. Um auch große DNA-Fragmente erfolgreich zu transferieren, wurde die DNA durch 2-mal 15-minütiges Waschen mit

300 ml 0,25 M HCl depuriniert und das Agarosegel anschließend mit dH<sub>2</sub>O kurz gespült. Es folgte die Denaturierung der doppelsträngigen DNA durch 30-minütige Inkubation mit 300 ml Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1 M NaCl), an die sich eine 2-mal 30-minütige Neutralisierungsphase in 300 ml Neutralisierungslösung (1 M NH<sub>4</sub>Ac, 0,02 M NaOH) anschloss.

#### 5.4.1.2 Immunochemische Detektion von DNA

Die Gesamt-DNA wurde mit Hilfe eines Trockenblots aus dem Agarosegel auf eine positiv geladene Nylonmembran (Cat. No. 1417240, ROCHE GmbH) über Nacht übertragen (Aufbau: 1 kg Gewicht, Papierhandtücher, 2x Whatmanpapier, Agarosegel und Nylonmembran). Im Anschluss wurde die Nylonmembran 10 min auf Whatmanpapier getrocknet und die DNA durch UV-Bestrahlung (2x 120.000 µJ/cm<sup>2</sup>) in einem „Stratalinker 1800“ (STRATAGENE, AGILENT TECHNOLOGIES SALES & SERVICES GmbH & Co. KG) fixiert. Die Nylonmembran konnte so entweder aufbewahrt oder weiter bearbeitet werden.

Die Nylonmembran wurde 2 h bei 65 °C in 40 ml SN-Hyb.-Puffer prähybridisiert, der Puffer ausgetauscht und im Anschluss für mindestens 7 h oder über Nacht bei 65 °C mit der gewählten Sonde hybridisiert. Hierfür wurden 50 µl frisch denaturierte DIG-gelabelte Sonde (10 min, 100 °C) in 10 ml SN-Hyb.-Puffer gegeben (die so angesetzte Hybridisierungslösung war mehrfach verwendbar). Es folgten zwei 20-minütige Waschschrte in 50 ml Southern-Waschpuffer bei 65 °C. Alle folgenden Waschschrte erfolgten bei Raumtemperatur. Zunächst wurde die Nylonmembran für 5 min mit 30 ml DIG-Waschpuffer gewaschen, gefolgt von einer 1,5-stündigen Blockierung in 40 ml DIG2. Daraufhin wurde die Membran mit 10 ml Antikörperlösung (1 µl Anti-Digoxigenin-Antikörper (1:10.000), 5 min bei 13.000 UpM bei 4 °C abzentrifugiert in 10 ml DIG2) für ~1 h inkubiert und nach dem Entfernen der Antikörperlösung 2-mal 15 min in 50 ml DIG-Waschpuffer geschwenkt. Nach einer 5-minütigen Aquilibrierung in 40 ml DIG3 folgte schließlich eine 5-minütige Inkubation in 10 ml CDP-Star-Lösung (bis zu 10-mal verwendbar). Die Nylonmembran wurde eingeschweißt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Detektion erfolgte in der Dunkelkammer durch Auflegen auf einen „Amersham Hyperfilm<sup>TM</sup> ECL, RPN1674K“ (GE HEALTHCARE LIFE



SCIENCES) oder eine „Chemostar Professional Apparatur“ (INTAS SCIENCE IMAGING INSTRUMENTS GmbH) bei einer Expositionszeit von 5 s - 30 min.

#### **5.4.2 Sequenzierung von DNA**

In Vorbereitung für Auftragssequenzierung wurden 5 µl DNA (0,6 - 0,7 µg), 1 µl 50 mM Tris-HCl (pH 8,8) und 1 µl Oligonukleotid-Lösung (20 µM) gemischt. Die Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruch-Methode (Sanger *et al.*, 1992) als Extended Hotshot durch die SEQUENCE LABORATORIES GmbH.

### **5.5 Analyse von RNA**

#### **5.5.1 Nachweis von RNA „Northern-Analyse“**

##### **5.5.1.1 Präparation von RNA (Cross & Tinkenberg, 1991)**

Für die RNA-Isolierung wurden 25 ml der jeweiligen *S. cerevisiae*-Kultur bei 3.000 UpM für 4 min bei 3.000 UpM geerntet, der Überstand verworfen und das Zellpellet entweder in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur späteren Präparation bei -80 °C aufbewahrt oder direkt mit 15 ml dH<sub>2</sub>O gewaschen. Das Pellet wurde in 1 ml eiskaltem TE-Puffer resuspendiert und nach der Überführung in ein 2,2 ml Sicherheitsreaktionsgefäß für 4 min bei 3.000 UpM und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und in jedes Reaktionsgefäß wurden 250 µl Glasperlen (Ø 0,25-0,5 mm), 400 µl TE-gesättigte „Roti®-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung zur RNA-Isolation“ im Verhältnis 25 : 24 : 1 (CARL ROTH GmbH & Co. KG) sowie 400 µl Cross-RNA-Puffer 1 zugegeben. Der Aufschluss erfolgte durch 10-minütiges Schütteln auf einem „Vibrax Basic“ (IKA) bei 4 °C. Nach 5-minütiger Zentrifugation (1300 UpM, 4 °C) wurde die obere wässrige Phase abgenommen und in ein mit 1 ml eiskaltem 100%igen EtOH vorbereiteten Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine 20-minütige Inkubation bei -20 °C, um die RNA zu fällen, die im Anschluss durch 5-minütiges Zentrifugieren bei 13.000 UpM und 4 °C pelettiert wurde. Das gewonnene Pellet wurde in 30-50 µl Cross-RNA-Puffer II aufgenommen und innerhalb von 10 min bei 65 °C gelöst. Die isolierte RNA-Lösung wurde mit Hilfe des „NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer“ (FISHER SCIENTIFIC GmbH) auf ihre

Konzentration und Qualität überprüft, wobei das Verhältnis 260/280 nm zwischen 1,9 und 2,1 liegen sollte. Ein Verhältnis 260/280 nm von 2,0 steht hierbei für höchste Reinheit.

#### **5.5.1.2 Denaturierende RNA-Gelelektrophorese (modifiziert nach McMaster & Carmichael, 1977)**

Die RNA-Proben wurden in einem 1,4%igen Agarosegel (2,1 g Agarose wurde in 135 ml dH<sub>2</sub>O aufgekocht, auf ~60 °C abgekühlt und mit 15 ml MOPS-Puffer versetzt) in MOPS-Puffer aufgetrennt. Je Spur wurden jeweils eine 30 µl Probe mit 17 µg RNA aufgetragen, die sich wie folgt zusammensetzte:

|        |                           |
|--------|---------------------------|
| 9,2 µl | RNA und dH <sub>2</sub> O |
| 2,4 µl | 10x MOPS-Puffer           |
| 2,4 µl | 8 M Glyoxal               |
| 12 µl  | DMSO                      |
| 4 µl   | RNA-Ladepuffer            |

Nach einem 15-minütigen Denaturierungsschritt bei 65 °C und kurzem Anzentrifugieren wurden die Proben bis zur Auftragung auf Eis aufbewahrt. Die elektrophoretische Auftrennung der RNA erfolgte bei 65 V und automatisch angepasster Stromstärke für 3-4 h bzw. bis die blaue Bromphenolblau-Front etwa 3/4 des Gels erreicht hatte. Während der Auftrennung wurde der Laufpuffer immer wieder durchmischt, um einen Temperaturgradienten und eine zu starke Erhitzung des Laufpuffers in der Gel-Elektrophoresekammer zu vermeiden. Nach der Auftrennung wurde das Gel mehrere Male mit dH<sub>2</sub>O gewaschen.

#### **5.5.1.3 Immunochemische Detektion von RNA**

Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe eines Kapillarblots mit 10x SSC-Puffer über Nacht aus dem Agarosegel auf eine „Hybond-N<sup>TM</sup>-Nylonmembran“ (GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES) transferiert (1 kg Gewicht, Papierhandtücher, 2x Whatmanpapier, Agarosegel (kopfstehend, Taschen wegschneiden), Whatmanpapier als Brücke zum Pufferreservoir, Nylonmembran, Gelschlitten und Wanne mit 10x SSC-Puffer). Im

Anschluss wurde die Nylonmembran 10 min auf Whatmanpapier getrocknet und die RNA durch UV-Bestrahlung ( $2 \times 120.000 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ ) in einem „Stratalinker 1800“ (STRATAGENE, AGILENT TECHNOLOGIES SALES & SERVICES GmbH & Co. KG) fixiert. Die Nylonmembran konnte so entweder aufbewahrt oder weiter bearbeitet werden.

Die Nylonmembran wurde 2 h bei  $65^\circ\text{C}$  in 40 ml SN-Hyb.-Puffer prähybridisiert, der Puffer ausgetauscht und im Anschluss für mindestens 7 h oder über Nacht bei  $65^\circ\text{C}$  mit der ersten Sonde hybridisiert. Hierfür wurden 50  $\mu\text{l}$  frisch denaturierte DIG-gelabelte Sonde (10 min,  $100^\circ\text{C}$ ) in 10 ml SN-Hyb.-Puffer gegeben (die so angesetzte Hybridisierungslösung war mehrfach verwendbar). Es schlossen sich zwei jeweils 45-minütige Waschschrte in 40 ml SN-Hyb.-Puffer an, wonach der Puffer gegen die zweite frisch denaturierte Sonde in 10 ml SN-Hyb.-Puffer ausgetauscht wurde. Diese zweite Hybridisierung erfolgte ebenfalls für 7 h oder über Nacht bei  $65^\circ\text{C}$ . Es folgten zwei 20-minütige Waschschrte in 50 ml Northern-Waschpuffer bei  $65^\circ\text{C}$ . Alle folgenden Waschschrte erfolgten bei Raumtemperatur.

Ab diesem Punkt ist das Protokoll zu dem in Kapitel 5.4.1.2 „Immunochemische Detektion von DNA“ beschriebenen identisch und schließt an den 5-minütigen Waschschrte der Nylonmembran mit 30 ml DIG-Waschpuffer an.

## **5.5.2 Transkriptom-Analyse**

### **5.5.2.1 Wachstumsbedingungen**

Alle in der Expressionsanalyse verwendeten Hefestämme (Wildtypstamm (YHUM0909) und eine *rim101*-Deletionsmutante (YHUM1461)) wurden ausschließlich in YNB+Ura-Medium von  $\text{OD}_{600} = 0,3$  bis zu einer  $\text{OD}_{600} = 0,7$  angezogen, für 5 min bei 2.000 UpM zentrifugiert und danach das Medium gewechselt. Es folgte eine 3-stündige Inkubation in 25 mM HEPES gepuffertem YNB+Ura-Medium unter pH 4,5, pH 7 bzw. pH 8. Insgesamt wurden für die weitere Analyse zwei Ansätze pro Stamm und Bedingung, d.h. zwei unabhängige biologische Replikate an verschiedenen Tagen herangezogen und die Gesamt-RNA isoliert.

### 5.5.2.2 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung für die Transkriptomanalyse aus *S. cerevisiae* erfolgte mit Hilfe des „RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit“ (QIAGEN GmbH) nach Angaben des Herstellers „Protocol: Purification of Total RNA from Yeast – 1c Mechanical disruption of cells“. Hierbei erfolgte nach der RNA-Präparation ein DNA-Verdau mit RNase freier DNase I (FERMENTAS GmbH) nach Angaben des Herstellers.

### 5.5.2.3 Probenaufbereitung nach dem „GeneChip<sup>®</sup> Expression Analysis Technical Manual“ (AFFYMETRIX GmbH)

Alle folgenden Probenaufbereitungsschritte für die „GeneChip<sup>®</sup> Yeast Genome 2.0 Array“ Expressionsanalyse erfolgten, sofern nicht anders angegeben, nach den Herstellerangaben für das Ein-Schritt-Amplifikations-Protokoll „GeneChip<sup>®</sup> Expression Analysis Technical Manual“ (AFFYMETRIX GmbH) nach kombinierten Protokollen der Firmen AFFYMETRIX und INVITROGEN.

*cDNA-Synthese (altern. Protokoll) „GeneChip<sup>®</sup> HT One-Cycle cDNA Synthesis Kit“:*

Erststrang-cDNA-Synthese:

Für die cDNA-Erststrang-Synthese wurden 8 µg gereinigte RNA, 2 µl verdünnte poly-A RNA-Kontrolle (Verdünnungen: 1. 1:20, 2. 1:50 und 3. 1:7) („Eukaryotic Poly-A RNA Control Kit“) und 2 µl 50 µM T7-OLigo(dt) Primer in einem Gesamtvolumen von 12 µl mit RNase freiem Wasser aufgenommen, gemischt und für 10 min bei 70 °C inkubiert. Danach wurde der Ansatz zentrifugiert und 2 min bei 4 °C gelagert. Pro „RNA/T7-Oligo(dt) Primer-Mix“ wurden 7 µl „Erststrang-Mastermix“ hinzugegeben, der sich aus 4 µl 5x Erststrangpuffer, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl dNTP-Mix zusammensetzte. Der 17 µl Gesamtansatz wurde vorsichtig gemischt und für 5 s anzentrifugiert. Es folgte ein 2-minütiger Inkubationsschritt bei 42 °C. Nach Zugabe von 1 µl SuperScript<sup>™</sup> II (Reverse Transkriptase), Durchmischen und kurzem Anzentrifugieren wurde der Ansatz für 1 h bei 42 °C und im Anschluss für 2 min bei 4 °C inkubiert.

### Zweitstrang-cDNA-Synthese:

Für die Zweitstrang-Synthese wurden zu jeder Erststrang-Synthese-Probe 130 µl „Zweitstrang-Synthese-Master-Mix“ hinzugegeben, der sich aus 91 µl H<sub>2</sub>O, 30 µl 5x Zweitstrangpuffer, 3 µl 10 mM dNTP-Mix, 1 µl *E. coli*-DNA-Ligase (10 U/ml), 4 µl *E. coli*-DNAPolymerase I und 1 µl *E. coli*-RNaseH zusammensetzte. Der Gesamtansatz wurde nach vorsichtigem Mischen und kurzem Anzentrifugieren für 2 h bei 16 °C inkubiert. Im Anschluss wurden 2 µl T4-DNA-Polymerase zugegeben, der Ansatz für weitere 5 min bei 16 °C inkubiert und die Reaktion mit 10 µl 0,5 M EDTA gestoppt.

### *Aufreinigung doppelsträngiger cDNA „Sample Cleanup Module“*

Zu jeder Probe doppelsträngiger cDNA wurden 600 µl cDNA-Bindepuffer gegeben, der Ansatz gevortext und der Gesamtansatz auf eine cDNA-Reinigungssäule aufgetragen (optional: sofern der Ansatz keine Gelbfärbung zeigte, wurden 10 µl 3 M Natriumacetat-Lösung pH 5 zugegeben). Es folgte ein 1-minütiger Zentrifugationsschritt bei 10.000 UpM je Aliquot des aufgetragenen Gesamtansatzes bei Raumtemperatur. Das Eluat wurde verworfen und die Säule auf ein neues Sammelröhrchen gesetzt. Es folgte ein Waschschrift mit 750 µl cDNA-Waschpuffer und ein weiterer Zentrifugationsschritt für 5 min bei 13.000 UpM mit geöffnetem Reinigungssäulen-Deckel. Die Elution der cDNA erfolgte mit 14 µl cDNA-Elutionspuffer und 1-minütiger Zentrifugation bei Raumtemperatur. Die cDNA-Qualitätskontrolle erfolgte auf einem „Agilent 2100-Bioanalyzer<sup>®</sup>“ (AGILENT TECHNOLOGIES DEUTSCHLAND GmbH) und orientierte sich an dem Protokoll der Firma QIAGEN GMBH. Die genaue Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem Herstellerprotokoll hervor.

### *Synthese Biotin-markierter cRNA „GeneChip IVT Labeling Kit“:*

Für die *in vitro*-Transkription der cDNA wurden 12 µl cDNA in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 8 µl RNase freies Wasser, 4 µl 10x IVT Labeling Puffer, 12 µl IVT Labeling NTP-Mix und 4 µl IVT Labeling Enzym-Mix hinzugegeben. Der Ansatz wurde kurz gevortext, anzentrifugiert und für 16 h bei 37 °C inkubiert (alternativ konnte 1 µl T7-RNA-Polymerase hinzugegeben werden, wodurch sich die Inkubationszeit auf 4 h reduzierte).

*Aufreinigung und Quantifizierung Biotin-markierter cRNA „Sample Cleanup Module“:*

Zur Aufreinigung der Biotin-markierten cRNA wurden 60 µl H<sub>2</sub>O zum *in vitro*-Transkriptions-Reaktionsansatz pipettiert und für 3 s gevortext. Zu dem Ansatz wurden 350 µl IVTcRNA-Bindpuffer gegeben und erneut für 3 s gevortext. Anschließend wurden 250 µl 100%iges EtOH zugegeben und die Lösung durch Pipettieren gemischt. Dieser Ansatz wurde auf IVT-cRNA-Säulen aufgetragen und für 15 s bei 10.000 UpM bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Eluat und das Sammelröhrchen wurden verworfen und die Säule auf ein neues Sammelröhrchen gesetzt. Nach Zugabe von 500 µl IVTcRNA-Waschpuffer wurden die Säulen erneut für 15 s bei 10.000 UpM bei Raumtemperatur zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurden 500 µl 80%iges EtOH zugegeben und die Säule erneut für 15 s bei 10.000 UpM bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Verwerfen des Eluates wurde die Säule für 5 min bei 13.000 UpM Raumtemperatur zentrifugiert. Die Säule wurde auf ein neues Sammelröhrchen gegeben und zur Elution der cRNA 11 µl H<sub>2</sub>O auf die Matrix pipettiert, die Säule für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und für 1 min bei 13.000 UpM zentrifugiert, worauf ein weiterer Elutionsschritt mit 10 µl H<sub>2</sub>O folgte. Die Qualitätskontrolle der cRNA erfolgte mit 1:100 oder 1:200 verdünnten Proben auf einem „Agilent 2100-Bioanalyzer“<sup>®</sup> (AGILENT TECHNOLOGIES DEUTSCHLAND GmbH) und orientierte sich an dem Protokoll der Firma QIAGEN. Die genaue Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem Herstellerprotokoll hervor.

*cRNA-Fragmentierung „Sample Cleanup Module“:*

Für eine Fragmentierungsreaktion nach dem AFFYMETRIX-Protokoll wurden 20 µg cRNA eingesetzt, die zusammen mit 8 µl Mg<sup>2+</sup>-haltigem 5x Fragmentations-Puffer und H<sub>2</sub>O in einem Gesamtvolumen von 40 µl aufgenommen wurden. Der Ansatz wurde gemischt, für 35 min bei 94 °C inkubiert und anschließend auf Eis aufbewahrt. Die Qualität der fragmentierten cRNA wurde mit 1:100 oder 1:200 verdünnten Proben auf einem „Agilent 2100-Bioanalyzer“<sup>®</sup> (AGILENT TECHNOLOGIES DEUTSCHLAND GmbH) überprüft und orientierte sich an dem Protokoll der Firma QIAGEN. Die genaue Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem Herstellerprotokoll hervor.

*Array-Hybridisierung:*

Für die Array-Hybridisierung wurden 5 µg fragmentierte cRNA mit 1,7 µl Kontrolloligo B2, 5 µl 20x Hybridisierungskontrollen, 1 µl Heringssperma-DNA (10 mg/ml), 1 µl

BSA, 50 µl 2x Hybridisierungspuffer und 10 µl DMSO in einem Gesamtvolumen von 100 µl gemischt. Dieser Ansatz wurde für 5 min bei 99 °C erhitzt, dann für 5 min bei 45 °C inkubiert und 5 min bei 13.000 UpM bei Raumtemperatur zentrifugiert. 130 µl Ansatz wurden in den Microchip pipettiert, der zuvor mit 160 µl 1x Hybridisierungspuffer bei 45 °C für 10 min äquilibriert worden war. Nach Verschließen der Chip-Septen mit Klebeband wurde der Chip bei 45 °C und 60 UpM für 16-18 h hybridisiert. Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Affymetrix. Die genaue Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem Herstellerprotokoll hervor.

#### *Array-Detektion:*

Vorbereitend für die Detektion wurde der Array nach der Hybridisierung entleert und mit 300 µl Waschpuffer A befüllt. Die Nachweisreaktionen wurden mit einem SAPE-Mix, bestehend aus 300 µl 2x Stain-Puffer, 24 µl BSA (50 mg/ml) und 6 µl Streptavidin-Phycoerythrin (1mg/ml) (SAPE) in einem Gesamtvolumen von 600 µl, sowie einer Antikörper-Mischung, bestehend aus 300 µl 2x Stain-Puffer, 24 µl BSA (50 mg/ml), 6 µl Ziegen-IgG (10 mg/ml) und 3,6 µl biotinyliertem Antikörper (0,5 mg/ml) in einem Gesamtvolumen von 600 µl durchgeführt. Für alle Wasch- und Detektionsschritte wurde die „GeneChip Fluidics Station 400“ mit dem „Mini\_euk2“-Programm verwendet. Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Affymetrix. Die genaue Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem Herstellerprotokoll hervor.

#### *Datenanalyse:*

Im Anschluss an die Wasch- und Markierungsschritte wurden die Arrays mit Hilfe eines „GeneArrayScanner 3000 7G“ (AFFYMETRIX GmbH) eingelesen. Unter Verwendung des Programms „Affymetrix Microarray Suite“ (MAS 5.0) wurde das resultierende Bild als nicht-skalierte RNA Signal-Intensitäts-Datei (CEL) mit der Affymetrix Command Console Software gesichert, die gewonnenen Daten ausgewertet, normalisiert, die Expressionswerte kalkuliert und im Anschluss als Excel-Datei gespeichert.

Die Analyse der Expressionsänderungen erfolgte mittels Microsoft Excel. Es wurde der p-Wert bestimmt, wobei das Ergebnis die Wahrscheinlichkeit eines gepaarten t-Tests

mit zweiseitiger Verteilung berücksichtigt, und wie folgt berechnet (<http://office.microsoft.com/de-de/excel-help/ttest-HP005209325.aspx>):

### SYNTAX

**TTEST(Matrix1;Matrix2;Seiten;Typ)**

Für die durchgeführte Berechnung wurden die Parameter **Seiten** = 2 und **Typ** = 1 gesetzt.

**Matrix1** ist die erste Datengruppe

**Matrix2** ist die zweite Datengruppe

**Seiten** bestimmt die Anzahl der Endflächen (Schwänze)

Ist **Seiten** = 1, verwendet TTEST eine Endfläche (einseitiger Test). Ist **Seiten** = 2, verwendet TTEST eine Endfläche (zweiseitiger Test).

**Typ** bestimmt den Typ des durchzuführenden t-Tests:

1 = gepaart

2 = Zwei Stichproben, gleiche Varianz (homoskedastisch)

3 = Zwei Stichproben, ungleiche Varianz (heteroskedastisch)

Sofern nicht anders angegeben, wurden nur Gene, die in den jeweiligen Ausgangsvergleichen unter den getesteten Bedingungen einen p-Wert  $\leq 0,05$  und eine um mindestens Faktor 2 veränderte Expression aufwiesen, in den weiteren Analysen verwendet. Alle Daten der Auswertungen sind im Anhang als Daten-CD angefügt.

Die Ausgangsvergleiche waren Grundlage für die Bildung eines Venn-Diagramms, das in seinen Schnittmengen ähnlich differentiell regulierte Gene zusammenfasst.

Für die weitere statistische Analyse wurde ein Test auf hypergeometrische Verteilung mittels FunSpec (Functional Specification; <http://funspec.med.utoronto.ca/>) mit einem p-Wert  $\leq 0,01$  durchgeführt, dem die Datenbank FUNCAT (MIPS Functional Categories, <http://mips.gsf.de/proj/funcatDB/>, Version 24. März 2009) (Ruepp *et al.*, 2004) zu Grunde liegt. In dieser Analyse wurden die differentiell exprimierten Gene aller Vergleiche, sowie aller Teil- und Schnittmengen untersucht. Wenn möglich wurden funktionell angereicherte Sub-Kategorien zum Zwecke der Übersichtlichkeit



zusammengefasst und daran anschließend die relative Verteilung der in der GO-Annotation angereicherten Gene in funktionellen Kategorien in einem Diagramm dargestellt.

#### *Hierarchisches Clustering mittels „GenePattern“:*

Die nicht-skalierten RNA Signal-Intensitäts-Dateien (CEL) der ausgelesenen Yeast Genome 2.0 Arrays wurden mit dem Modul „ExpressionFileCreator“ der Anwendung „GenePattern“ (<http://genepattern.broadinstitute.org/>) (Reich *et al.*, 2006) in MAS 5.0 normalisierte GCT-Dateien überführt und die gewünschten *S. cerevisiae* Expressionsdaten mittels Excel extrahiert. Das hierarchische Clustering wurde mit dem Modul „Hierarchical Clustering“ nach Standardvorgaben durchgeführt (Eisen *et al.*, 1998; Golub *et al.*, 1999; Reich *et al.*, 2006).

#### **5.5.2.4 NMF-Konsensus-Clustering**

Die nicht-skalierten RNA Signal-Intensitäts-Dateien (CEL) der ausgelesenen Yeast Genome 2.0 Arrays wurden mit dem Modul „ExpressionFileCreator (GenePattern)“ (Reich *et al.*, 2006) in MAS 5.0 normalisierte GCT-Dateien überführt und die *S. cerevisiae* Expressionsdaten mittels Excel für die weitere Analyse extrahiert. Es folgte ein Clustering durch Nicht-negative Matrix-Faktorisierung (NMF) (verwendete Parameter: k initial 2, k final 5, num clusterings 20, max num iterations 2000, error function divergence, random seed 123456789, stop convergence 40, stop frequency 10), einem unüberwachten lernenden Algorithmus (Lee & Seung, 1999), durch den molekulare Muster in den erhobenen Expressionsdaten identifiziert werden können (Brunet *et al.*, 2004). Dabei wird die nicht negative Matrix  $X$  ( $X = N \times M = \text{Reihe} \times \text{Spalte} = \text{„Datenmatrix“}$ ) (hier der Microarray-Chip, der beim Auslesen nicht so angesteuert werden kann, dass er negative Fluoreszenzen emittiert, also Werte geringer als 0) in zwei Matrizen  $W$  ( $W = N \times k = \text{„Quellmatrix“}$ ) und  $H$  ( $H = k \times M = \text{„Mischmatrix“}$ ), die ebenfalls nur nicht-negative Einträge haben, zerlegt. In Microarrays entspricht  $N$  der Zahl an Genen, meist mehrerer tausend,  $M$  gibt die Anzahl der Experimente wieder.  $k$  steht für die Anzahl an Klassen, die in Abhängigkeit der Heterogenität des Datensets bestimmt werden. Der NMF-Algorithmus berechnet dann iterativ eine Annäherung von  $X \sim WH$ . Zunächst werden zufällig initialisierte Matrizen mit der ungefähren Größe von  $W$  und  $H$  berechnet, wobei  $W$  und  $H$  so gesucht werden,

dass das Produkt  $WH$  der Ausgangsmatrix  $X$  möglichst „nahe“ kommt.  $N$  als auch  $M$  werden zufällig mit nicht negativen Werten  $k$  initialisiert, die im Allgemeinen kleiner als  $N$  wie auch  $M$  gewählt werden. Somit sind  $W$  und  $H$  kleiner als  $X$ , woraus sich eine Faktorisierung der ursprünglichen Expressionsdaten ergibt. Die Grundidee hinter diesem Clustering ist, dass die Clusterabgrenzung der Proben auch bei zufälligen Ausgangspunkten der Berechnung keine große Variation zeigen sollte. Nach zahlreichen Berechnungen mit zufälligen Initialstartpunkten bildet sich die in Abbildung 33 A dargestellte Konsensus-Matrix, die die Stabilität des Clusterings, assoziiert mit dem vorgegebenen  $k$  wiedergibt.

## 5.6 Protein-Methoden

### 5.6.1 Herstellung von Proteinextrakten aus *S. cerevisiae* für die immunochemische Detektion (modifiziert nach Riezman *et al.*, 1983)

Sofern nicht anders angegeben, wurden die verwendeten *S. cerevisiae*-Stämme bis zu einer  $OD_{600} = 0,7$  inkubiert, eine Zellmenge, die einer  $OD_{600} = 1$  entsprach durch Zentrifugation für 2 min bei 13.000 UpM geerntet, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml  $dH_2O$  aufgenommen. Zu jeder Probe wurden 170  $\mu$ l 2 M NaOH und 17  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol pipettiert. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurden 190  $\mu$ l 50%iges TCA zugegeben und der Ansatz 5-mal invertiert. Es folgte eine 10-minütige Inkubation der Zellextrakte auf Eis, an die sich eine 2-minütige Zentrifugation bei 13.000 UpM und 4 °C anschloss. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml eiskaltem 100%igen Aceton überschichtet. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 2 min bei 13.000 UpM und 4 °C, wonach der Überstand komplett abgenommen und das Pellet luftgetrocknet wurde. Im Anschluss wurde das Pellet in 17  $\mu$ l 0,1 M NaOH und 17  $\mu$ l 3x SDS-Ladepuffer aufgenommen und für 10 min bei 85 °C inkubiert, woran sich ein letzter 10-minütiger Zentrifugationsschritt bei 13.000 UpM bei Raumtemperatur anschloss. Die Rohextrakte wurden direkt auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen oder bei -20 °C aufbewahrt.

### 5.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese: „SDS-PAGE“ (modifiziert nach Laemmli, 1970)

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer relativen Molekularmasse erfolgte unter denaturierenden und diskontinuierlichen Bedingungen. Es wurden selbstgegossene Gele mit 10 % Acrylamid im Trenngel und 4 % Acrylamid im Sammelgel verwendet (Tabelle 13). Die Elektrophorese der Proben erfolgte in einer mit einem Elektrophorese-Puffer gefüllten "Mini-PROTEAN® 3" Apparatur (BIO-RAD LABORATORIES GmbH). In die Taschen wurden 5-30 µl des vorbereiteten Proteinextraktes aufgetragen. Bis die Lauffront das Trenngel erreicht hatte, wurden 70 V Spannung (~20 min) bei automatisch angepasster Stromstärke angelegt. Danach wurde die Spannung auf 200 V erhöht und die Elektrophorese für ~45 min fortgeführt. Als Größenstandard wurde „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ (FERMENTAS GmbH) verwendet.

### 5.6.3 Immunochemische Detektion von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen „Western-Analyse“ (Towbin *et al.*, 1979)

Für die Immunodetektion wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus dem SDS-Polyacrylamid-Gel auf eine „Protran® Nitrocellulosemembran“ (SCHLEICHER & SCHUELL BIOSCIENCE GmbH) durch Elektroblothing über Nacht bei 35 V oder im Schnellverfahren für 1,5 h bei 4 °C und 100 V in einer „Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell“ (BIO-RAD LABORATORIES GmbH) in Transfer-Puffer übertragen.

Optional wurde der erfolgreiche Protein-Transfer auf die Nitrocellulosemembran durch 1-minütige Färbung mit Ponceau S-Lösung überprüft. Die Entfärbung der Membran erfolgte durch einen 3-mal 10-minütigen Waschschrift mit TBS-Puffer/3 % (w/v) Magermilchpulver. Anschließend wurde die Membran mit TBS-T-Puffer gespült und weiterbearbeitet.

#### *Antikörper-Bindung:*

Zunächst erfolgte eine Block-Inkubation der Nitrocellulosemembran für 1 h in TBS-T-Puffer/3 % (w/v) Magermilchpulver bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran zweimal mit TBS-T-Puffer gewaschen. Danach wurde die Membran mit

10 ml TBS-T-Puffer/3 % (w/v) Magermilchpulver und dem Primär-Antikörper (Tabelle 11) in einem 50 ml Reaktionsgefäß (SARSTEDT AG & Co.) für 1 h auf einem Rollinkubator „SRT6-Roller“ (Bibby Scientific Limited) inkubiert. Alternativ wurde dieser Schritt über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Die Membran wurde 3-mal 5 min mit TBS-T-Puffer gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen und im Anschluss 1 h mit einem Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper (Tabelle 11) in TBS-T-Puffer/3 % (w/v) Magermilchpulver rollend inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschrte mit TBS-T-Puffer, um ungebundene Antikörper zu entfernen.

#### *Detektion:*

Die Detektion der Proteine auf der Membran erfolgte nach der ECL-Methode (Tesfaigzi *et al.*, 1994). Hierfür wurde jeweils 10 ml einer Luminol- und Wasserstoffperoxid-Lösung angesetzt, vereinigt und 1 min mit der Antikörper-behandelten Membran inkubiert. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte durch Exposition auf einem „Hyperfilm-ECL<sup>TM</sup>“ (GE Healthcare LIFE SCIENCES), wobei sich die Expositionszeit nach der Signalstärke richtete. Der ECL-Film wurde mit einem „Medical Film Processor SRX-101A“ (KONICA MINOLTA MEDICAL & GRAPHIC Inc.) entwickelt. Anschließend wurde der Film mit einem „Epson Perfection 4990 Photo“ (EPSON DEUTSCHLAND GmbH) gescannt. Alternativ erfolgte die Detektion der Chemilumineszenz mit einer „Chemostar Professional Apparatur“ (INTAS SCIENCE IMAGING INSTRUMENTS GmbH). Die Expositionszeit richtete sich ebenfalls nach der Signalstärke und lag im ein- bis zweistelligen Minutenbereich.

#### *Quantifizierung:*

Die relativen Proteinmengen wurden anhand der Intensität des Mengenstandards unter Verwendung der Software „ImageQuant TL“ (GE Healthcare LIFE SCIENCES) normalisiert. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden die erhaltenen Werte in Prozent zum Referenzwert angegeben.

#### *„Strippen“ der Nitrocellulosemembran:*

Um einen weiteren Antikörpernachweis auf einer bereits immunochemisch behandelten Nitrocellulosemembran durchzuführen, wurden die gebundenen Antikörper durch 5-minütiges Waschen mit Stripping-Puffer bei Raumtemperatur entfernt. Die Neutralisierung der Membran erfolgte durch dreimaliges Waschen mit TBS-Puffer.

Nach einer erneuten 30-minütigen Block-Reaktion mit TBS-T-Puffer/3 % (w/v) Magermilchpulver erfolgte die erneute Primär-Antikörperinkubation.

#### **5.6.4 Herstellung von Proteinextrakten aus *S. cerevisiae* für den photometrischen $\beta$ -Galaktosidase-Test (Rose & Botstein, 1983)**

Vorkulturen der zu untersuchenden *S. cerevisiae*-Stämme wurden über Nacht bei 30 °C in 5 ml YNB-Medium angezogen. Aus der Vorkultur wurde eine 10 ml Hauptkultur in YNB-Medium inokkuliert und auf eine  $OD_{600} = 0,25$  eingestellt. Die Kulturen wurden bis zu einer  $OD_{600} = 1$  bei 30 °C auf einem Drehschüttler inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension auf Eis gekühlt und bei 4 °C 5 min bei 3.000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Zellpellet in 1 ml Aufbruch-Puffer gewaschen und in 250  $\mu$ l Aufbruch-Puffer mit 1 mM DTT resuspendiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen bei -20 °C gelagert oder direkt weiterverarbeitet.

Für den  $\beta$ -Galaktosidase-Test wurden 200  $\mu$ l Glasperlen ( $\emptyset$  0,25-0,5 mm) und 12,5  $\mu$ l PMSF-Lösung zu den Zellen gegeben und die Zellen durch 5-minütiges Schütteln auf einem Multivortexer „Vibrax Basic“ (IKA) bei 4 °C aufgeschlossen. Danach wurden weitere 250  $\mu$ l Aufbruch-Puffer mit 1 mM DTT zugegeben. Die Zelltrümmer wurden durch 15-minütiges Zentrifugieren mit 13.000 UpM bei 4 °C entfernt und der Überstand in eine 96-Well Mikrotiterplatte (GREINER BIO-ONE GmbH) überführt.

#### **5.6.5 Photometrischer $\beta$ -Galaktosidase-Test (Rose & Botstein, 1983)**

Für die quantitative Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität wurden 10  $\mu$ l Proteinextrakt zu jeweils 200  $\mu$ l vorgelegtem Z-Puffer pro Well einer 96-Well Mikrotiterplatte (GREINER BIO-ONE GmbH) hinzugegeben (doppelt pipettiert). Die Mikrotiterplatte wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 27  $\mu$ l o-NPG (4 mg/ml in Z-Puffer) gestartet. Der Reaktionsansatz wurde bei 30 °C so lange inkubiert, bis eine Gelbfärbung zu erkennen war. Durch Zugabe von 67  $\mu$ l 1 M  $Na_2CO_3$ -Lösung wurde die Reaktion gestoppt, die Reaktionszeit notiert und die Extinktion bei  $\lambda = 420$  nm mit einem Spektrophotometer „Model 680 Microplate Reader“ (BIO-RAD LABORATORIES GmbH) bestimmt.

Die spezifische Aktivität des Proteinextraktes ergab sich aus:

$$\text{Spezifische Aktivität} = \frac{E_{420 \text{ nm}} \times 0,304}{0,0045 \times c_{\text{Extrakt}} \times V_{\text{Extrakt}} \times \Delta t}$$

$E_{420 \text{ nm}}$  = Extinktion bei  $\lambda = 420 \text{ nm}$

$c_{\text{Extrakt}}$  = Konzentration des Proteinextraktes [mg/ml]

$V_{\text{Extrakt}}$  = Volumen des Proteinextraktes [ml]

$\Delta t$  = Dauer der Reaktion [min]

$E_{420 \text{ nm}}$  entspricht der gemessenen Extinktion des Produktes o-Nitrophenol. Der Faktor 0,304 korrigiert das Reaktionsvolumen und der Faktor 0,0045 repräsentiert den Extinktionskoeffizienten einer 1 nM/ml o-Nitrophenol-Lösung. Die spezifische Aktivität wird in [nm/min/mg Proteinextrakt] angegeben.

#### 5.6.6 Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford, 1976)

Der Proteingehalt der Zell-Extrakte wurde nach der Methode von Bradford, 1976, bestimmt. Hierfür wurde frische 1:5 mit dH<sub>2</sub>O verdünnte „Roti<sup>®</sup>-Quant“-Lösung (CARL ROTH GmbH & Co. KG) angesetzt und 300 µl pro Well der Mikrotiterplatte vorgelegt. Im Anschluss wurden jeweils 10 µl Proteinextrakt zugegeben (doppelt pipettiert) und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei  $\lambda = 595 \text{ nm}$  mit einem Spektrophotometer „Model 680 Microplate Reader“ (BIO-RAD LABORATORIES GmbH) bestimmt. Die Proteinmenge ergab sich durch eine parallel erstellte Bradford-Eichkurve mit BSA-Konzentrationen von 0,1-1,6 mg/ml in Doppelbestimmung.

## 5.7 Untersuchung von *S. cerevisiae*

### 5.7.1 Waschtest zur Bestimmung des haploid adhäsiven Wachstums auf Agar (Roberts & Fink, 1994)

Die zu untersuchenden Stämme wurden, sofern nicht anders angegeben, großflächig auf YNB- oder SC-Medium ausgestrichen und 3-7 Tage bei 30 °C inkubiert. Das Gesamtwachstum wurde fotografisch mit einer „Powershot 620A“ (CANON DEUTSCHLAND GmbH) dokumentiert. Im Anschluss wurden die Platten vorsichtig und gleichmäßig unter einem schwachen Wasserstrahl geschwenkt, wobei Zellen nicht adhäsiver Stämme weggespült wurden, Zellen adhäsiver Stämme jedoch auf der Agar-Oberfläche verblieben. Bei Bedarf schloss sich ein stärkerer Waschschrift an. Das Ergebnis wurde nach jedem Waschschrift fotografisch dokumentiert.

### 5.7.2 Waschtest zur Bestimmung des haploid adhäsiven Wachstums auf Polystyrol (Reynolds & Fink, 2001)

Sofern nicht anders angegeben, wurden Vorkulturen des zu untersuchenden *S. cerevisiae*-Stammes in 25 ml YNB-Medium bei 30 °C über Nacht angezogen. Aus der Vorkultur wurde eine 50 ml Hauptkultur in YNB-Medium inokkuliert und auf eine  $OD_{600} = 0,3$  eingestellt. Die Hauptkultur wurde schüttelnd bis zu einer  $OD_{600} = 0,7$  bei 30 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen in 3x 10 ml Aliquots aufgeteilt, für 3 min bei 2.000 UpM zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in YNB-Medium (pH 4,5, pH 7 bzw. pH 8; 25 mM HEPES gepuffert) aufgenommen und auf eine  $OD_{600}$  von 0,7 eingestellt. Jeweils 600 µl der Kultur wurden in ein Well einer „Cellstar® TC-48-Well“-Polystyrol-Mikrotiterplatte pipettiert (doppelt pipettiert) und für 3 h bei 30 °C statisch inkubiert.

Zum Anfärben der Zellen wurden jeweils 30 µl einer 1%igen Kristallviolett-Lösung (1 % (w/v) in dH<sub>2</sub>O) in jedes Well pipettiert und die Platte für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die nicht adhärenen Zellen durch 2x 2-maliges Schwenken der Mikrotiterplatte in jeweils frischem eiskaltem Wasser gewaschen, die Mikrotiterplatte einmal kopfüber ausgeschlagen und über Nacht mit aufgelegtem Papiertuch bei Raumtemperatur getrocknet. Durch Zugabe von 600 µl 1%iger SDS-Lösung (1 % SDS (w/v) in dH<sub>2</sub>O) und 20-minütiger Inkubation bei

Raumtemperatur wurden die Ansätze kräftig resuspendiert, worauf ein erneuter 20-minütiger Inkubationsschritt folgte. Danach wurde die Mikrotiterplatte für 2 min bei 3.000 UpM zentrifugiert und 50 µl der Probe in eine 96-Well-Polystyrol-Mikrotiterplatte überführt (doppelt pipettiert) und mit 300 µl dH<sub>2</sub>O verdünnt. Die Absorption der Proben wurde bei  $\lambda = 595$  nm mit einem Spektrophotometer „Model 680 Microplate Reader“ (BIO-RAD LABORATORIES GmbH) bestimmt. Die absolute Absorption des Blindwertes (50 µl 1%iger SDS-Lösung zzgl. 300 µl dH<sub>2</sub>O) wurde von allen Messwerten subtrahiert. Die gewonnenen Messwerte wurden für eine bessere Vergleichbarkeit in Prozent zum Referenzwert angegeben.

### 5.7.3 Sedimentationstest zur Bestimmung der Zell-Verklumpung

Für den Sedimentationstest wurde eine Vorkultur mit dem zu untersuchenden *S. cerevisiae*-Stamm in 25 ml YNB+Ura-Medium bei 30 °C über Nacht angezogen. Aus der Vorkultur wurde eine 100 ml Hauptkultur in YNB+Ura-Medium inokkuliert und auf eine OD<sub>600</sub> = 0,3 eingestellt. Die Hauptkultur wurde schüttelnd bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,7 bei 30 °C inkubiert und im Anschluss in 3x 30 ml Aliquots aufgeteilt, die für 3 min bei 2.000 UpM zentrifugiert wurden. Die Zellen wurden in YNB-Medium (pH 7 bzw. pH 8; 25 mM HEPES gepuffert) aufgenommen und ruhend für 3 h in Reagenzgläsern inkubiert. Anschließend wurden die Reagenzgläser nach kurzem Vortexen für 1 h ruhend bei Raumtemperatur inkubiert. Zu den Zeitpunkten  $\Delta t = 0$  min,  $\Delta t = 30$  min und  $\Delta t = 60$  min wurde die Zellsedimentation qualitativ durch ein Foto „Powershot 620A“ (CANON DEUTSCHLAND GmbH) dokumentiert.

### 5.7.4 FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting)

Für die FACS-Analyse wurde der verwendete *S. cerevisiae*-Stamm in einer 25 ml Vorkultur in YNB+His+Leu+Ura bei 30 °C über Nacht angezogen. Aus der Vorkultur wurde eine entsprechend supplementierte 100 ml Hauptkultur auf eine OD<sub>600</sub> = 0,2 eingestellt. Die Hauptkultur wurde schüttelnd bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,7 bei 30 °C inkubiert und im Anschluss in drei 30 ml Aliquots aufgeteilt, die für 3 min bei 2.000 UpM zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in YNB+His+Leu+Ura-Medium (pH 4,5, pH 7 bzw. pH 8; 25 mM HEPES gepuffert)



aufgenommen. Nach einer 3-stündigen Inkubation bei 30 °C wurde jeweils ein Volumen Kultur, das einer 10 ml Kultur mit einer Zelldichte von  $OD_{600} = 0,6$  entsprach, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden 2-mal mit 20 ml PBS-Puffer gewaschen und in 25 ml PBS-Puffer/3,7% (v/v) Formaldehyd in einem 50 ml Reaktionsgefäß bei 4 °C über Nacht auf einem Rollinkubator „SRT6-Roller“ (Bibby Scientific Limited) fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen für 3 min bei 2.000 UpM zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen mit 30 ml Phosphat-Puffer gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen in 15 ml PBS-Puffer aufgenommen.

#### *Zellvereinzelung mittels Ultraschall:*

Mittels Ultraschall wurden die Zellen für die spätere FACS-Analyse unter Verwendung eines „BRANSON Sonifier 250“ und eines „BRANSON Ultrasonics Converters; Spitze 05) (BRANSON ULTRASCHALL, EMERSON TECHNOLOGIES GmbH & Co. OHG), inkubiert auf Eis, vereinzelt. Die verwendeten Parameter waren: Duty cycle: 50 %, Output Control: „7“ Micro Tip Limit. Für die unter pH 4,5- und pH 7-Bedingungen inkubierten Zellen wurden 175 Zyklen, für die unter pH 8-Bedingungen inkubierten Zellen 325 Zyklen für eine erfolgreiche Zell-Separation benötigt, die durch Lichtmikroskopie mit einem „Axio Imager.A1“ (CARL ZEISS AG) überprüft wurde.

#### *Antikörpermarkierung:*

Die Antikörpermarkierung erfolgte, sofern nicht anders angegeben, nach Guo *et al.*, 2000. Die Zellen wurden 2 min bei 2.000 UpM zentrifugiert, der Überstand abgenommen, die Zellen in 10 ml PBS-Puffer/2 % BSA aufgenommen und für 30 min in einem 15 ml Reaktionsgefäß auf einem Rollinkubator bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension für 2 min bei 2.000 UpM zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Zellen in 10 ml PBS-Puffer/2 % BSA mit Primärantikörper (anti-HA Antikörper aus Maus, 1:1.000; Cat. No. H3663, SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH) aufgenommen und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem 2-mal 5-minütigen Waschschrift mit 5 ml PBS-Puffer/2 % BSA wurden die Zellen in 10 ml PBS-Puffer/2 % BSA mit Sekundärantikörper „CY3-konjugiertem Ziege-anti-Maus Antikörper, 1:750; Cat. No. C2181, SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH) aufgenommen und für 20 min abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubiert. Alle folgenden Schritte erfolgten nach Möglichkeit abgedunkelt und kühl gelagert auf Eis. Nach einem erneuten 2-mal 5-minütigen Waschschrift mit 5 ml PBS-Puffer/2 % BSA

wurden die Zellen in 5 ml FACS-Puffer „BD FACSTFlow™ Sheath Fluid, Cat. No. 342003“ (BECTON DICKINSON GmbH) aufgenommen. Für die FACS-Analyse wurden 50 µl der Zellsuspension mit 250 µl FACS-Puffer verdünnt und ~100.000 Ereignisse mit einem Durchflusszytometer „FACSCalibur“ (BECTON DICKINSON GmbH) unter Verwendung eines 488 nm Argon-Lasers und einem 585/42 nm Bandpass-Filter detektiert. Alle Ereignisse wurden für die Darstellung der Graphen und die Berechnung der mittleren Fluoreszenz verwendet.

### 5.7.5 Scan-Elektronenmikroskopie

Der verwendete *S. cerevisiae*-Stamm wurde in 25 ml YNB+Ura über Nacht bei 30 °C in einer Vorkultur angezogen. Aus der Vorkultur wurde eine 100 ml Hauptkultur in YNB+Ura angeimpft und auf eine  $OD_{600} = 0,2$  eingestellt. Die Hauptkultur wurde bei 30 °C bis zu einer  $OD_{600} = 0,7$  inkubiert und anschließend in 2x 30 ml Aliquots aufgeteilt, die für 3 min bei 2.000 UpM zentrifugiert wurden. Die Zellen wurden in YNB+Ura-Medium (pH 7 bzw. pH 8; 25 mM HEPES gepuffert) aufgenommen und schüttelnd für weitere 3 h inkubiert. Danach wurde jeweils ein Volumen Kultur, das einer 12 ml Kultur mit einer Zelldichte von  $OD_{600} = 0,7$  entsprach, für 3 min bei 2.000 UpM zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Zellen mit 10 ml Sörensen-Puffer gewaschen und anschließend im gleichen Volumen Puffer aufgenommen. Von dieser Zellsuspension wurden 5 ml für 2 min bei 2.000 UpM zentrifugiert, das Zell-Pellet in 900 µl Sörensen-Puffer/3,5 % (v/v) Formaldehyd aufgenommen und in ein 2,2 ml Sicherheitsreaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden über Nacht bei 20 °C gelagert.

#### *Präparation der Zellen für die Scan-Elektronenmikroskopie:*

Die in Sörensen-Puffer/3,5 % (v/v) Formaldehyd fixierten Zellen wurden 3-mal mit Sörensen-Puffer gewaschen und hierfür jeweils 1 min bei 2.000 UpM zentrifugiert. Im Anschluss an den letzten Waschschrift wurden die Zellen in 50 µl Sörensen-Puffer aufgenommen. Aus dieser Zellsuspension wurden einige Tropfen auf eine vorbereitete Nylonmembran (~0,5 cm Kantenlänge) „Roti®-Nylon plus“ (CARL ROTH GmbH & Co. KG) aufgebracht und für 5 min für die Sedimentation der Zellen inkubiert. Die auf die Nylonmembran aufgetropften Zellen wurden durch Lagerung auf einem mit Sörensen-Puffer getränkten Whatmanpapier in einer Petrischale gegen Austrocknung geschützt. Die Nylonmembran wurde zur Nachfixierung in ein Schnappdeckelglas

überführt, sofort mit 1,5 ml Osmiumtetroxid-Lösung überschichtet und für 2 h bei Raumtemperatur dunkel inkubiert. Alle folgenden Schritte erfolgten in Schnappdeckelgläschen mit 1,5 ml Lösungsvolumen bei Raumtemperatur. Es folgten drei 10-minütige Waschschrte mit dH<sub>2</sub>O (Austausch und Inkubation). Daran anschließend wurde die Probe zunächst für 1 h in Ethylenglycolmonoethylether inkubiert, gefolgt von einer weiteren Inkubation in dieser Lösung über Nacht, um eine künstliche Schrumpfung der Probe zu vermeiden. Die Dehydrierung der Proben erfolgte durch einen 3-mal 10-minütigen Waschschrte mit 100%igem Aceton (Austausch und Inkubation), worin die Probe bis zur weiteren Präparation auch gelagert werden konnte. Im Anschluss wurde die Probe mit einem „Balzers Union Polaron E 3000“ (BALZERS UNION AG) Critical-Point getrocknet und nach dem Besputtern mit Gold durch einen „Balzers Union Sputter Coater“ (BALZERS UNION AG) mit einem Scan-Elektronenmikroskop „S-530 Scanning Electron Microscopy“ (HITACHI HIGH-TECHNOLOGIES EUROPE) untersucht. Digitale Fotoaufnahmen wurden mit einem „DISS 5 - Digital Image Scanning System“ (POINT ELECTRONIC GmbH) aufgenommen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Ahn J, Park S, Kang H (1995) Inactivation of the UASI of *STA1* by glucose and *STA10* and identification of two loci, *SNS1* and *MSS1*, involved in *STA10*-dependent repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **246**: 529-537
- Arechiga-Carvajal E, Ruiz-Herrera J (2005) The *RIM101*/pacC homologue from the basidiomycete *Ustilago maydis* is functional in multiple pH-sensitive phenomena. *Eukaryot Cell* **4**: 999-1008
- Arst H, Peñalva MA (2003) pH regulation in *Aspergillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems. *Trends Genet* **19**: 224-231
- Baek YU, Li M, Davis DA (2008) *Candida albicans* ferric reductases are differentially regulated in response to distinct forms of iron limitation by the Rim101 and CBF transcription factors. *Eukaryot Cell* **7**: 1168-1179
- Baek YU, Martin SJ, Davis DA (2006) Evidence for novel pH-dependent regulation of *Candida albicans* Rim101, a direct transcriptional repressor of the cell wall beta-glycosidase Phr2. *Eukaryot Cell* **5**: 1550-1559
- Bähler J (2005) Cell-cycle control of gene expression in budding and fission yeast. *Annu Rev Genet* **39**: 69-94
- Bardwell L, Cook JG, Voora D, Baggott DM, Martinez AR, Thorner J (1998) Repression of yeast Ste12 transcription factor by direct binding of unphosphorylated Kss1 MAPK and its regulation by the Ste7 MEK. *Genes Dev* **12**: 2887-2898
- Barrales R, Jimenez J, Ibeas J (2008) Identification of novel activation mechanisms for *FLO11* regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **178**: 145-156
- Barwell KJ, Boysen JH, Xu W, Mitchell AP (2005) Relationship of *DFG16* to the Rim101p pH response pathway in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **4**: 890-899
- Bayly JC, Douglas LM, Pretorius IS, Bauer FF, Dranginis AM (2005) Characteristics of Flo11-dependent flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **5**: 1151-1156
- Bean JM, Siggia ED, Cross FR (2005) High functional overlap between MluI cell-cycle box binding factor and Swi4/6 cell-cycle box binding factor in the G1/S transcriptional program in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **171**: 49-61
- Bensen E, Martin S, Li M, Berman J, Davis D (2004) Transcriptional profiling in *Candida albicans* reveals new adaptive responses to extracellular pH and functions for Rim101p. *Mol Microbiol* **54**: 1335-1351
- Berkey CD, Carlson M (2006) A specific catalytic subunit isoform of protein kinase CK2 is required for phosphorylation of the repressor Nrg1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **50**: 1-10

- Bester M, Pretorius I, Bauer F (2006) The regulation of *Saccharomyces cerevisiae* *FLO* gene expression and Ca<sup>2+</sup>-dependent flocculation by Flo8p and Mss11p. *Curr Genet* **49**: 375-383
- Bidard F, Blondin B, Dequin S, Vezinhet F, Barre P (1994) Cloning and analysis of a *FLO5* flocculation gene from *S. cerevisiae*. *Curr Genet* **25**: 196-201
- Bidard F, Bony M, Blondin B, Dequin S, Barre P (1995) The *Saccharomyces cerevisiae* *FLO1* flocculation gene encodes for a cell surface protein. *Yeast* **11**: 809-822
- Bignell E, Negrete-Urtasun S, Calcagno AM, Haynes K, Arst HN, Jr., Rogers T (2005) The *Aspergillus* pH-responsive transcription factor PacC regulates virulence. *Mol Microbiol* **55**: 1072-1084
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523
- Biswas K, Rieger KJ, Morschhauser J (2003) Functional characterization of *CaCBF1*, the *Candida albicans* homolog of centromere binding factor 1. *Gene* **323**: 43-55
- Böhm S, Frishman D, Mewes HW (1997) Variations of the C2H2 zinc finger motif in the yeast genome and classification of yeast zinc finger proteins. *Nucleic Acids Res* **25**: 2464-2469
- Bölker M (2001) *Ustilago maydis* - a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology* **147**: 1395-1401
- Bony M, Thines-Sempoux D, Barre P, Blondin B (1997) Localization and cell surface anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* flocculation protein Flo1p. *J Bacteriol* **179**: 4929-4936
- Borggreffe T, Davis R, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Kornberg RD (2002) A complex of the Srb8, -9, -10, and -11 transcriptional regulatory proteins from yeast. *J Biol Chem* **277**: 44202-44207
- Bowers K, Lottridge J, Helliwell S, Goldthwaite L, Luzio P, Stevens T (2004) Protein-protein interactions of ESCRT complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic* **5**: 194-210
- Bowman S, Free S (2006) The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays* **28**: 799-808
- Boysen JH, Mitchell AP (2006) Control of Bro1-domain protein Rim20 localization by external pH, ESCRT machinery, and the *Saccharomyces cerevisiae* Rim101 pathway. *Molecular Biology of the Cell* **17**: 1344-1353
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Braus GH, Grundmann O, Brückner S, Mösch HU (2003) Amino acid starvation and Gcn4p regulate adhesive growth and *FLO11* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* **14**: 4272-4284
- Breeden L (1996) Start-specific transcription in yeast. *Curr Top Microbiol Immunol* **208**: 95-127

- Brown MR, Gilbert P (1993) Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents. *J Appl Bacteriol* **74 Suppl:** 87S-97S
- Brunet JP, Tamayo P, Golub TR, Mesirov JP (2004) Metagenes and molecular pattern discovery using matrix factorization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101:** 4164-4169
- Bürglin TR (1991) The TEA domain: a novel, highly conserved DNA-binding motif. *Cell* **66:** 11-12
- Burnie JP, Carter TL, Hodgetts SJ, Matthews RC (2006) Fungal heat-shock proteins in human disease. *FEMS Microbiol Rev* **30:** 53-88
- Caddick M, Brownlee A, Arst H (1986) Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet* **203:** 346-353
- Calcagno-Pizarelli AM, Negrete-Urtasun S, Denison SH, Rudnicka JD, Bussink HJ, Munera-Huertas T, Stanton L, Hervas-Aguilar A, Espeso EA, Tilburn J, Arst HN, Jr., Peñalva MA (2007) Establishment of the ambient pH signaling complex in *Aspergillus nidulans*: PalI assists plasma membrane localization of PalH. *Eukaryot Cell* **6:** 2365-2375
- Calderone R (2001) Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **9:** 327-335
- Cannon JF, Tatchell K (1987) Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* genes encoding subunits of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol* **7:** 2653-2663
- Cappellaro C, Baldermann C, Rachel R, Tanner W (1994) Mating type-specific cell-cell recognition of *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall attachment and active sites of a- and alpha-agglutinin. *EMBO J* **13:** 4737-4744
- Carlson M (1997) Genetics of transcriptional regulation in yeast: connections to the RNA polymerase II CTD. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13:** 1-23
- Carlson M (1999) Glucose repression in yeast. *Curr Opin Microbiol* **2:** 202-207
- Casadaban MJ, Cohen SN (1980) Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **138:** 179-207
- Castañó I, Pan SJ, Zupancic M, Hennequin C, Dujon B, Cormack BP (2005) Telomere length control and transcriptional regulation of subtelomeric adhesins in *Candida glabrata*. *Mol Microbiol* **55:** 1246-1258
- Causton HC, Ren B, Koh SS, Harbison CT, Kanin E, Jennings EG, Lee TI, True HL, Lander ES, Young RA (2001) Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Molecular Biology of the Cell* **12:** 323-337
- Celenza JL, Carlson M (1989) Mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* *SNF1* protein kinase and evidence for functional interaction with the *SNF4* protein. *Mol Cell Biol* **9:** 5034-5044

- Chavel C, Dionne H, Birkaya B, Joshi J, Cullen P (2010) Multiple signals converge on a differentiation MAPK pathway. *PLoS Genet* **6**
- Chen MH, Shen ZM, Bobin S, Kahn PC, Lipke PN (1995) Structure of *Saccharomyces cerevisiae* alpha-agglutinin. Evidence for a yeast cell wall protein with multiple immunoglobulin-like domains with atypical disulfides. *J Biol Chem* **270**: 26168-26177
- Cheng G, Wozniak K, Wallig MA, Fidel PL, Jr., Trupin SR, Hoyer LL (2005) Comparison between *Candida albicans* agglutinin-like sequence gene expression patterns in human clinical specimens and models of vaginal candidiasis. *Infect Immun* **73**: 1656-1663
- Cliften P, Sudarsanam P, Desikan A, Fulton L, Fulton B, Majors J, Waterston R, Cohen BA, Johnston M (2003) Finding functional features in *Saccharomyces* genomes by phylogenetic footprinting. *Science* **301**: 71-76
- Colombo S, Ma P, Cauwenberg L, Winderickx J, Crauwels M, Teunissen A, Nauwelaers D, de Winde JH, Gorwa MF, Colavizza D, Thevelein JM (1998) Involvement of distinct G-proteins, Gpa2 and Ras, in glucose- and intracellular acidification-induced cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **17**: 3326-3341
- Conlan RS, Tzamarias D (2001) Sfl1 functions via the co-repressor Ssn6-Tup1 and the cAMP-dependent protein kinase Tpk2. *J Mol Biol* **309**: 1007-1015
- Cook JG, Bardwell L, Kron SJ, Thorner J (1996) Two novel targets of the MAP kinase Kss1 are negative regulators of invasive growth in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **10**: 2831-2848
- Corden JL, Patturajan M (1997) A CTD function linking transcription to splicing. *Trends Biochem Sci* **22**: 413-416
- Cormack B, Ghori N, Falkow S (1999) An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. *Science* **285**: 578-582
- Cornet M, Richard ML, Gaillardin C (2009) The homologue of the *Saccharomyces cerevisiae* RIM9 gene is required for ambient pH signalling in *Candida albicans*. *Res Microbiol* **160**: 219-223
- Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ (1987) Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* **41**: 435-464
- Critchley IA, Douglas LJ (1987) Role of glycosides as epithelial cell receptors for *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* **133**: 637-643
- Cross FR, Tinkelenberg AH (1991) A potential positive feedback loop controlling *CLN1* and *CLN2* gene expression at the start of the yeast cell cycle. *Cell* **65**: 875-883
- Cullen PJ, Sprague GF, Jr. (2000) Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 13619-13624

- Cyert MS (2003) Calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: how yeast go crazy in response to stress. *Biochem Biophys Res Commun* **311**: 1143-1150
- Dallies N, Francois J, Paquet V (1998) A new method for quantitative determination of polysaccharides in the yeast cell wall. Application to the cell wall defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**: 1297-1306
- Davis D (2003) Adaptation to environmental pH in *Candida albicans* and its relation to pathogenesis. *Curr Genet* **44**: 1-7
- Davis D (2009) How human pathogenic fungi sense and adapt to pH: the link to virulence. *Curr Opin Microbiol*
- De Las Peñas A, Pan SJ, Castaño I, Alder J, Cregg R, Cormack BP (2003) Virulence-related surface glycoproteins in the yeast pathogen *Candida glabrata* are encoded in subtelomeric clusters and subject to *RAP1*- and *SIR*-dependent transcriptional silencing. *Genes Dev* **17**: 2245-2258
- de Nadal E, Casadomé L, Posas F (2003) Targeting the MEF2-like transcription factor Smp1 by the stress-activated Hog1 mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol* **23**: 229-237
- Denison S, Negrete-Urtasun S, Mingot J, Tilburn J, Mayer W, Goel A, Espeso E, Peñalva M, Arst H (1998) Putative membrane components of signal transduction pathways for ambient pH regulation in *Aspergillus* and meiosis in *Saccharomyces* are homologous. *Mol Microbiol* **30**: 259-264
- Dever TE, Hinnebusch AG (2005) GCN2 whets the appetite for amino acids. *Mol Cell* **18**: 141-142
- Diez E, Alvaro J, Espeso EA, Rainbow L, Suarez T, Tilburn J, Arst HN, Jr., Peñalva MA (2002) Activation of the *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor requires two proteolytic steps. *EMBO J* **21**: 1350-1359
- Dirick L, Moll T, Auer H, Nasmyth K (1992) A central role for *SWI6* in modulating cell cycle Start-specific transcription in yeast. *Nature* **357**: 508-513
- Dodou E, Treisman R (1997) The *Saccharomyces cerevisiae* MADS-box transcription factor Rlm1 is a target for the Mpk1 mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol* **17**: 1848-1859
- Domergue R, Castaño I, De Las Peñas A, Zupancic M, Lockatell V, Hebel JR, Johnson D, Cormack BP (2005) Nicotinic acid limitation regulates silencing of *Candida adhesins* during UTI. *Science* **308**: 866-870
- Douglas LM, Li L, Yang Y, Dranginis AM (2007) Expression and characterization of the flocculin Flo11/Muc1, a *Saccharomyces cerevisiae* mannoprotein with homotypic properties of adhesion. *Eukaryot Cell* **6**: 2214-2221
- Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**: 6127-6145



Dranginis A, Rauceo J, Coronado J, Lipke P (2007) A biochemical guide to yeast adhesins: glycoproteins for social and antisocial occasions. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**: 282-294

Dujon B (1996) The yeast genome project: what did we learn? *Trends Genet* **12**: 263-270

Dujon B, Sherman D, Fischer G, Durrens P, Casaregola S, Lafontaine I, De Montigny J, Marck C, Neugeglise C, Talla E, Goffard N, Frangeul L, Aigle M, Anthouard V, Babour A, Barbe V, Barnay S, Blanchin S, Beckerich JM, Beyne E, Bleykasten C, Boisrame A, Boyer J, Cattolico L, Confanioleri F, De Daruvar A, Despons L, Fabre E, Fairhead C, Ferry-Dumazet H, Groppi A, Hantraye F, Hennequin C, Jauniaux N, Joyet P, Kachouri R, Kerrest A, Koszul R, Lemaire M, Lesur I, Ma L, Muller H, Nicaud JM, Nikolski M, Oztas S, Ozier-Kalogeropoulos O, Pellenz S, Potier S, Richard GF, Straub ML, Suleau A, Swennen D, Tekaiia F, Wesolowski-Louvel M, Westhof E, Wirth B, Zeniou-Meyer M, Zivanovic I, Bolotin-Fukuhara M, Thierry A, Bouchier C, Caudron B, Scarpelli C, Gaillardin C, Weissenbach J, Wincker P, Souciet JL (2004) Genome evolution in yeasts. *Nature* **430**: 35-44

Durocher D, Henckel J, Fersht AR, Jackson SP (1999) The FHA domain is a modular phosphopeptide recognition motif. *Mol Cell* **4**: 387-394

Eisen M, Spellman P, Brown P, Botstein D (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 14863-14868

Erdman S, Lin L, Malczynski M, Snyder M (1998) Pheromone-regulated genes required for yeast mating differentiation. *J Cell Biol* **140**: 461-483

Ernst JF (2000) Regulation of dimorphism in *Candida albicans*. *Contrib Microbiol* **5**: 98-111

Espeso EA, Arst HN, Jr. (2000) On the mechanism by which alkaline pH prevents expression of an acid-expressed gene. *Mol Cell Biol* **20**: 3355-3363

Espeso EA, Peñalva MA (1996) Three binding sites for the *Aspergillus nidulans* PacC zinc-finger transcription factor are necessary and sufficient for regulation by ambient pH of the isopenicillin N synthase gene promoter. *J Biol Chem* **271**: 28825-28830

Fichtner L, Schulze F, Braus G (2007) Differential Flo8p-dependent regulation of *FLO1* and *FLO11* for cell-cell and cell-substrate adherence of *S. cerevisiae* S288c. *Mol Microbiol* **66**: 1276-1289

Filler S (2006) *Candida*-host cell receptor-ligand interactions. *Curr Opin Microbiol* **9**: 333-339

Fleet GH (1991) Cell walls. In: Rose, A H and Harrison J S (eds) *The yeasts*, London; Academic Press **4**, 2nd edn: 199-277

Fleet GH, Manners DJ (1976) Isolation and composition of an alkali-soluble glucan from the cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* **94**: 180-192

Foreman PK, Davis RW (1993) Point mutations that separate the role of *Saccharomyces cerevisiae* centromere binding factor 1 in chromosome segregation from its role in transcriptional activation. *Genetics* **135**: 287-296

- Forsburg SL, Guarente L (1989) Identification and characterization of *HAP4*: a third component of the CCAAT-bound *HAP2/HAP3* heteromer. *Genes Dev* **3**: 1166-1178
- Freifelder D (1960) Bud position in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **80**: 567-568
- Fu Y, Rieg G, Fonzi WA, Belanger PH, Edwards JE, Filler SG (1998) Expression of the *Candida albicans* gene *ALS1* in *Saccharomyces cerevisiae* induces adherence to endothelial and epithelial cells. *Infect Immun* **66**: 1783-1786
- Gagiano M, Bauer FF, Pretorius IS (2002) The sensing of nutritional status and the relationship to filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **2**: 433-470
- Gagiano M, van Dyk D, Bauer F, Lambrechts M, Pretorius I (1999a) Msn1p/Mss10p, Mss11p and Muc1p/Flo11p are part of a signal transduction pathway downstream of Mep2p regulating invasive growth and pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **31**: 103-116
- Gagiano M, Van Dyk D, Bauer FF, Lambrechts MG, Pretorius IS (1999b) Divergent regulation of the evolutionarily closely related promoters of the *Saccharomyces cerevisiae* *STA2* and *MUC1* genes. *J Bacteriol* **181**: 6497-6508
- Gancedo JM (2001) Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **25**: 107-123
- Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D, Brown PO (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* **11**: 4241-4257
- Gaur NK, Klotz SA (1997) Expression, cloning, and characterization of a *Candida albicans* gene, *ALA1*, that confers adherence properties upon *Saccharomyces cerevisiae* for extracellular matrix proteins. *Infect Immun* **65**: 5289-5294
- Gaur NK, Smith RL, Klotz SA (2002) *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* expressing *ALA1/ALS5* adhere to accessible threonine, serine, or alanine patches. *Cell Commun Adhes* **9**: 45-57
- Gavrias V, Andrianopoulos A, Gimeno CJ, Timberlake WE (1996) *Saccharomyces cerevisiae* *TEC1* is required for pseudohyphal growth. *Mol Microbiol* **19**: 1255-1263
- Gemmill TR, Trimble RB (1999) Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. *Biochim Biophys Acta* **1426**: 227-237
- Gimeno CJ, Fink GR (1992) The logic of cell division in the life cycle of yeast. *Science* **257**: 626
- Gimeno CJ, Fink GR (1994) Induction of pseudohyphal growth by overexpression of *PHD1*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene related to transcriptional regulators of fungal development. *Mol Cell Biol* **14**: 2100-2112
- Gimeno CJ, Ljungdahl PO, Styles CA, Fink GR (1992) Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* **68**: 1077-1090

- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG (1996) Life with 6000 genes. *Science* **274**: 546, 563-547
- Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES (1999) Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* **286**: 531-537
- Gray J, Petsko G, Johnston G, Ringe D, Singer R, Werner-Washburne M (2004) "Sleeping beauty": quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 187-206
- Green CB, Zhao X, Hoyer LL (2005) Use of green fluorescent protein and reverse transcription-PCR to monitor *Candida albicans* agglutinin-like sequence gene expression in a murine model of disseminated candidiasis. *Infect Immun* **73**: 1852-1855
- Groes M, Teilum K, Olesen K, Poulsen F, Henriksen A (2002) Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the carbohydrate-binding domain of flocculin, a cell-adhesion molecule from *Saccharomyces carlsbergensis*. *Acta Crystallographica Section D* **58**: 2135-2137
- Güldener U, Heck S, Fielder T, Beinhauer J, Hegemann J (1996) A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* **24**: 2519-2524
- Guo B, Styles CA, Feng Q, Fink GR (2000) A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 12158-12163
- Gupta SK, Kececioğlu JD, Schaffer AA (1995) Improving the practical space and time efficiency of the shortest-paths approach to sum-of-pairs multiple sequence alignment. *J Comput Biol* **2**: 459-472
- Hahn JS, Thiele DJ (2004) Activation of the *Saccharomyces cerevisiae* heat shock transcription factor under glucose starvation conditions by Snf1 protein kinase. *J Biol Chem* **279**: 5169-5176
- Hahn S, Guarente L (1988) Yeast *HAP2* and *HAP3*: transcriptional activators in a heteromeric complex. *Science* **240**: 317-321
- Hahn S, Pinkham J, Wei R, Miller R, Guarente L (1988) The *HAP3* regulatory locus of *Saccharomyces cerevisiae* encodes divergent overlapping transcripts. *Mol Cell Biol* **8**: 655-663
- Halme A, Bumgarner S, Styles C, Fink G (2004) Genetic and epigenetic regulation of the *FLO* gene family generates cell-surface variation in yeast. *Cell* **116**: 405-415
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580
- Harbison C, Gordon B, Lee T, Rinaldi N, Macisaac K, Danford T, Hannett N, Tagne J-B, Reynolds D, Yoo J, Jennings E, Zeitlinger J, Pokholok D, Kellis M, Rolfe A, Takusagawa K, Lander E, Gifford D, Fraenkel E, Young R (2004) Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome. *Nature* **431**: 99-104

- Haro R, Garciadeblas B, Rodríguez-Navarro A (1991) A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Lett* **291**: 189-191
- Hawser SP, Douglas LJ (1995) Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 2128-2131
- Hayashi M, Fukuzawa T, Sorimachi H, Maeda T (2005) Constitutive activation of the pH-responsive Rim101 pathway in yeast mutants defective in late steps of the MVB/ESCRT pathway. *Mol Cell Biol* **25**: 9478-9490
- Hayashi M, Ohkuni K, Yamashita I (1998) Control of division arrest and entry into meiosis by extracellular alkalinisation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**: 905-913
- Heise B, van der Felden J, Kern S, Malcher M, Brückner S, Mösch H-U (2010) The TEA transcription factor Tec1 confers promoter-specific gene regulation by mechanisms dependent and independent of Ste12. *Eukaryot Cell* **9**: 514-531
- Hengartner CJ, Myer VE, Liao SM, Wilson CJ, Koh SS, Young RA (1998) Temporal regulation of RNA polymerase II by Srb10 and Kin28 cyclin-dependent kinases. *Mol Cell* **2**: 43-53
- Herranz S, Rodríguez JM, Bussink HJ, Sánchez-Ferrero JC, Arst HN, Peñalva MA, Vincent O (2005) Arrestin-related proteins mediate pH signaling in fungi. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 12141-12146
- Hervás-Aguilar A, Rodríguez JM, Tilburn J, Arst HN, Jr., Peñalva MA (2007) Evidence for the direct involvement of the proteasome in the proteolytic processing of the *Aspergillus nidulans* zinc finger transcription factor PacC. *J Biol Chem* **282**: 34735-34747
- Hilkens J, Ligtenberg MJ, Vos HL, Litvinov SV (1992) Cell membrane-associated mucins and their adhesion-modulating property. *Trends Biochem Sci* **17**: 359-363
- Hinnebusch AG (1992) General and pathway-specific regulatory mechanisms controlling the synthesis of amino acid biosynthetic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. Broach, JR, Jones, EW, and Pringle, JR (eds) *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces cerevisiae: Gene Expression* Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY
- Hinnebusch AG (1997) Translational regulation of yeast *GCN4*. A window on factors that control initiator-trna binding to the ribosome. *J Biol Chem* **272**: 21661-21664
- Hinnebusch AG, Natarajan K (2002) Gcn4p, a master regulator of gene expression, is controlled at multiple levels by diverse signals of starvation and stress. *Eukaryot Cell* **1**: 22-32
- Hoffman CS, Winston F (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**: 267-272
- Hollenhorst PC, Bose ME, Mielke MR, Müller U, Fox CA (2000) Forkhead genes in transcriptional silencing, cell morphology and the cell cycle. Overlapping and distinct functions for *FKH1* and *FKH2* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **154**: 1533-1548

- Hong SP, Leiper FC, Woods A, Carling D, Carlson M (2003) Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 8839-8843
- Honigberg S, Purnapatre K (2003) Signal pathway integration in the switch from the mitotic cell cycle to meiosis in yeast. *J Cell Sci* **116**: 2137-2147
- Hoyer L (2001) The *ALS* gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **9**: 176-180
- Hoyer LL, Fundyga R, Hecht JE, Kapteyn JC, Klis FM, Arnold J (2001) Characterization of agglutinin-like sequence genes from non-albicans *Candida* and phylogenetic analysis of the *ALS* family. *Genetics* **157**: 1555-1567
- Hoyer LL, Hecht JE (2000) The *ALS6* and *ALS7* genes of *Candida albicans*. *Yeast* **16**: 847-855
- Hoyer LL, Payne TL, Hecht JE (1998) Identification of *Candida albicans ALS2* and *ALS4* and localization of als proteins to the fungal cell surface. *J Bacteriol* **180**: 5334-5343
- Huang G, Zhang M, Erdman SE (2003) Posttranslational modifications required for cell surface localization and function of the fungal adhesin Aga1p. *Eukaryot Cell* **2**: 1099-1114
- Hung W, Olson KA, Breitzkreutz A, Sadowski I (1997) Characterization of the basal and pheromone-stimulated phosphorylation states of Ste12p. *Eur J Biochem* **245**: 241-251
- Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28
- Ito T, Chiba T, Ozawa R, Yoshida M, Hattori M, Sakaki Y (2001) A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 4569-4574
- Jansen G, Wu C, Schade B, Thomas D, Whiteway M (2005) Drag&Drop cloning in yeast. *Gene* **344**: 43-51
- Jentoft N (1990) Why are proteins O-glycosylated? *Trends Biochem Sci* **15**: 291-294
- Jiang R, Carlson M (1997) The Snf1 protein kinase and its activating subunit, Snf4, interact with distinct domains of the Sip1/Sip2/Gal83 component in the kinase complex. *Mol Cell Biol* **17**: 2099-2106
- Jue CK, Lipke PN (2002) Role of Fig2p in agglutination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **1**: 843-845
- Kamai Y, Kubota M, Hosokawa T, Fukuoka T, Filler SG (2002) Contribution of *Candida albicans ALS1* to the pathogenesis of experimental oropharyngeal candidiasis. *Infect Immun* **70**: 5256-5258
- Kang S, Choi H (2005) Effect of surface hydrophobicity on the adhesion of *S. cerevisiae* onto modified surfaces by poly(styrene-ran-sulfonic acid) random copolymers. *Colloids Surf B Biointerfaces* **46**: 70-77

- Kapteyn JC, Hoyer LL, Hecht JE, Muller WH, Andel A, Verkleij AJ, Makarow M, Van Den Ende H, Klis FM (2000) The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. *Mol Microbiol* **35**: 601-611
- Kapteyn JC, Van Egmond P, Sievi E, Van Den Ende H, Makarow M, Klis FM (1999) The contribution of the O-glycosylated protein Pir2p/Hsp150 to the construction of the yeast cell wall in wild-type cells and beta 1,6-glucan-deficient mutants. *Mol Microbiol* **31**: 1835-1844
- Kaur R, Domergue R, Zupancic ML, Cormack BP (2005) A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Curr Opin Microbiol* **8**: 378-384
- Kent NA, Eibert SM, Mellor J (2004) Cbf1p is required for chromatin remodeling at promoter-proximal CACGTG motifs in yeast. *J Biol Chem* **279**: 27116-27123
- Kessler G, Nickerson WJ (1959) Glucomannan-protein complexes from cell walls of yeasts. *J Biol Chem* **234**: 2281-2285
- Kim T, Lee S, Kang H (2004) Glucose repression of *STA1* expression is mediated by the Nrg1 and Sfl1 repressors and the Srb8-11 complex. *Mol Cell Biol* **24**: 7695-7706
- Klis FM (1994) Review: cell wall assembly in yeast. *Yeast* **10**: 851-869
- Klis FM, Mol P, Hellingwerf K, Brul S (2002) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **26**: 239-256
- Klotz SA, Gaur NK, Lake DF, Chan V, Rauceo J, Lipke PN (2004) Degenerate peptide recognition by *Candida albicans* adhesins Als5p and Als1p. *Infect Immun* **72**: 2029-2034
- Knop M, Siegers K, Pereira G, Zachariae W, Winsor B, Nasmyth K, Schiebel E (1999) Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* **15**: 963-972
- Kobayashi O, Hayashi N, Kuroki R, Sone H (1998) Region of *FLO1* proteins responsible for sugar recognition. *J Bacteriol* **180**: 6503-6510
- Koch C, Moll T, Neuberg M, Ahorn H, Nasmyth K (1993) A role for the transcription factors Mbp1 and Swi4 in progression from G1 to S phase. *Science* **261**: 1551-1557
- Koch C, Nasmyth K (1994) Cell cycle regulated transcription in yeast. *Curr Opin Cell Biol* **6**: 451-459
- Köhler T, Wesche S, Taheri N, Braus GH, Mösch HU (2002) Dual role of the *Saccharomyces cerevisiae* TEA/ATTS family transcription factor Tec1p in regulation of gene expression and cellular development. *Eukaryot Cell* **1**: 673-686
- Kojic E, Darouiche R (2004) *Candida* infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev* **17**: 255-267
- Konno N, Ishii M, Nagai A, Watanabe T, Ogasawara A, Mikami T, Matsumoto T (2006) Mechanism of *Candida albicans* transformation in response to changes of pH. *Biol Pharm Bull* **29**: 923-926

- Koranda M, Schleiffer A, Endler L, Ammerer G (2000) Forkhead-like transcription factors recruit Ndd1 to the chromatin of G2/M-specific promoters. *Nature* **406**: 94-98
- Kraakman L, Lemaire K, Ma P, Teunissen A, Donaton M, Van Dijck P, Winderickx J, de Winde J, Thevelein J (1999) A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Mol Microbiol* **32**: 1002-1012
- Kron SJ, Styles CA, Fink GR (1994) Symmetric cell division in pseudohyphae of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **5**: 1003-1022
- Krüger J, Aichinger C, Kahmann R, Bölker M (1997) A MADS-box homologue in *Ustilago maydis* regulates the expression of pheromone-inducible genes but is nonessential. *Genetics* **147**: 1643-1652
- Kuchin S, Carlson M (1998) Functional relationships of Srb10-Srb11 kinase, carboxy-terminal domain kinase CTDK-I, and transcriptional corepressor Ssn6-Tup1. *Mol Cell Biol* **18**: 1163-1171
- Kuchin S, Vyas VK, Carlson M (2002) Snf1 protein kinase and the repressors Nrg1 and Nrg2 regulate *FLO11*, haploid invasive growth, and diploid pseudohyphal differentiation. *Mol Cell Biol* **22**: 3994-4000
- Kuchin S, Vyas VK, Carlson M (2003) Role of the yeast Snf1 protein kinase in invasive growth. *Biochem Soc Trans* **31**: 175-177
- Kuchin S, Yeghiayan P, Carlson M (1995) Cyclin-dependent protein kinase and cyclin homologs *SSN3* and *SSN8* contribute to transcriptional control in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 4006-4010
- Kullas A, Martin S, Davis D (2007) Adaptation to environmental pH: integrating the Rim101 and calcineurin signal transduction pathways. *Mol Microbiol* **66**: 858-871
- Kullas AL, Li M, Davis DA (2004) Snf7p, a component of the ESCRT-III protein complex, is an upstream member of the *RIM101* pathway in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **3**: 1609-1618
- Kumamoto C, Vines M (2005) Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces. *Annu Rev Microbiol* **59**: 113-133
- Kumamoto CA (2005) A contact-activated kinase signals *Candida albicans* invasive growth and biofilm development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 5576-5581
- Kumar C (1998) Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int J Food Microbiol* **42**: 9-27
- Kupchak BR, Garitaonandia I, Villa NY, Mullen MB, Weaver MG, Regalla LM, Kendall EA, Lyons TJ (2007) Probing the mechanism of *FET3* repression by Izh2p overexpression. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **1773**: 1124-1132
- Kussell E, Leibler S (2005) Phenotypic diversity, population growth, and information in fluctuating environments. *Science* **309**: 2075-2078

- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lamb T, Mitchell A (2003) The transcription factor Rim101p governs ion tolerance and cell differentiation by direct repression of the regulatory genes *NRG1* and *SMP1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **23**: 677-686
- Lamb TM, Xu W, Diamond A, Mitchell AP (2001) Alkaline response genes of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to the *RIM101* pathway. *J Biol Chem* **276**: 1850-1856
- Lambrechts MG, Bauer FF, Marmur J, Pretorius IS (1996) Muc1, a mucin-like protein that is regulated by Mss10, is critical for pseudohyphal differentiation in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 8419-8424
- Lee DD, Seung HS (1999) Learning the parts of objects by non-negative matrix factorization. *Nature* **401**: 788-791
- Lee M, Chatterjee S, Struhl K (2000) Genetic analysis of the role of Pol II holoenzyme components in repression by the Cyc8-Tup1 corepressor in yeast. *Genetics* **155**: 1535-1542
- Lemaire K, Van de Velde S, Van Dijck P, Thevelein JM (2004) Glucose and sucrose act as agonist and mannose as antagonist ligands of the G protein-coupled receptor Gpr1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* **16**: 293-299
- Lengeler KB, Davidson RC, D'Souza C, Harashima T, Shen WC, Wang P, Pan X, Waugh M, Heitman J (2000) Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 746-785
- Leza MA, Elion EA (1999) *POG1*, a novel yeast gene, promotes recovery from pheromone arrest via the G1 cyclin CLN2. *Genetics* **151**: 531-543
- Li F, Palecek SP (2003) EAP1, a *Candida albicans* gene involved in binding human epithelial cells. *Eukaryot Cell* **2**: 1266-1273
- Li F, Palecek SP (2005) Identification of *Candida albicans* genes that induce *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion and morphogenesis. *Biotechnol Prog* **21**: 1601-1609
- Li M, Martin S, Bruno V, Mitchell A, Davis D (2004) *Candida albicans* Rim13p, a protease required for Rim101p processing at acidic and alkaline pHs. *Eukaryot Cell* **3**: 741-751
- Li W, Mitchell AP (1997) Proteolytic activation of Rim1p, a positive regulator of yeast sporulation and invasive growth. *Genetics* **145**: 63-73
- Liao SM, Zhang J, Jeffery DA, Koleske AJ, Thompson CM, Chao DM, Viljoen M, van Vuuren HJ, Young RA (1995) A kinase-cyclin pair in the RNA polymerase II holoenzyme. *Nature* **374**: 193-196
- Lillie SH, Pringle JR (1980) Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. *J Bacteriol* **143**: 1384-1394



- Lin CH, MacGurn JA, Chu T, Stefan CJ, Emr SD (2008) Arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors regulate endocytosis and protein turnover at the cell surface. *Cell* **135**: 714-725
- Lipke PN, Kurjan J (1992) Sexual agglutination in budding yeasts: structure, function, and regulation of adhesion glycoproteins. *Microbiol Rev* **56**: 180-194
- Lipke PN, Ovalle R (1998) Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J Bacteriol* **180**: 3735-3740
- Lipman DJ, Altschul SF, Kececioglu JD (1989) A tool for multiple sequence alignment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 4412-4415
- Liu H (2001) Transcriptional control of dimorphism in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* **4**: 728-735
- Liu H, Styles CA, Fink GR (1996) *Saccharomyces cerevisiae* S288C has a mutation in *FLO8*, a gene required for filamentous growth. *Genetics* **144**: 967-978
- Lo WS, Dranginis AM (1996) *FLO11*, a yeast gene related to the *STA* genes, encodes a novel cell surface flocculin. *J Bacteriol* **178**: 7144-7151
- Lo WS, Dranginis AM (1998) The cell surface flocculin Flo11 is required for pseudohyphae formation and invasion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* **9**: 161-171
- Lowndes NF, Johnson AL, Breeden L, Johnston LH (1992) SWI6 protein is required for transcription of the periodically expressed DNA synthesis genes in budding yeast. *Nature* **357**: 505-508
- Lowndes NF, Johnson AL, Johnston LH (1991) Coordination of expression of DNA synthesis genes in budding yeast by a cell-cycle regulated trans factor. *Nature* **350**: 247-250
- Loy CJ, Lydall D, Surana U (1999) *NDD1*, a high-dosage suppressor of *cdc28-1N*, is essential for expression of a subset of late-S-phase-specific genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**: 3312-3327
- Loza L, Fu Y, Ibrahim AS, Sheppard DC, Filler SG, Edwards JE, Jr. (2004) Functional analysis of the *Candida albicans* *ALS1* gene product. *Yeast* **21**: 473-482
- Lu CF, Montijn RC, Brown JL, Klis F, Kurjan J, Bussey H, Lipke PN (1995) Glycosyl phosphatidylinositol-dependent cross-linking of alpha-agglutinin and beta 1,6-glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J Cell Biol* **128**: 333-340
- Lutfiyya LL, Iyer VR, DeRisi J, DeVit MJ, Brown PO, Johnston M (1998) Characterization of three related glucose repressors and genes they regulate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **150**: 1377-1391
- Lutfiyya LL, Johnston M (1996) Two zinc-finger-containing repressors are responsible for glucose repression of *SUC2* expression. *Mol Cell Biol* **16**: 4790-4797

- Madden K, Snyder M (1998) Cell polarity and morphogenesis in budding yeast. *Annu Rev Microbiol* **52**: 687-744
- Madhani HD, Fink GR (1997) Combinatorial control required for the specificity of yeast MAPK signaling. *Science* **275**: 1314-1317
- Madshus IH (1988) Regulation of intracellular pH in eukaryotic cells. *Biochem J* **250**: 1-8
- Maidan MM, De Rop L, Serneels J, Exler S, Rupp S, Tournu H, Thevelein JM, Van Dijck P (2005) The G protein-coupled receptor Gpr1 and the Galpha protein Gpa2 act through the cAMP-protein kinase A pathway to induce morphogenesis in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **16**: 1971-1986
- Mandel M, Higa A (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* **53**: 159-162
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982) Molecular Cloning. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*
- Mannhaupt G, Schnall R, Karpov V, Vetter I, Feldmann H (1999) Rpn4p acts as a transcription factor by binding to PACE, a nonamer box found upstream of 26S proteasomal and other genes in yeast. *FEBS Lett* **450**: 27-34
- Mark P (2008) Regulation der Transkription des Oberflächenflokkingens *FLO11* durch Komponenten des Dfg16-Rim101-Signalwegs. *Diplomarbeit*
- Martinez-Pastor MT, Marchler G, Schuller C, Marchler-Bauer A, Ruis H, Estruch F (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J* **15**: 2227-2235
- Marusyk R, Sergeant A (1980) A simple method for dialysis of small-volume samples. *Anal Biochem* **105**: 403-404
- Matheos DP, Kingsbury TJ, Ahsan US, Cunningham KW (1997) Tcn1p/Crz1p, a calcineurin-dependent transcription factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **11**: 3445-3458
- McIntosh EM, Atkinson T, Storms RK, Smith M (1991) Characterization of a short, cis-acting DNA sequence which conveys cell cycle stage-dependent transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **11**: 329-337
- McMaster GK, Carmichael GG (1977) Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 4835-4838
- McNabb DS, Xing Y, Guarente L (1995) Cloning of yeast *HAP5*: a novel subunit of a heterotrimeric complex required for CCAAT binding. *Genes Dev* **9**: 47-58

- Mendenhall MD, Hodge AE (1998) Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 1191-1243
- Mendizabal I, Rios G, Mulet JM, Serrano R, de Larrinoa IF (1998) Yeast putative transcription factors involved in salt tolerance. *FEBS Lett* **425**: 323-328
- Mendoza I, Rubio F, Rodríguez-Navarro A, Pardo JM (1994) The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **269**: 8792-8796
- Mingot JM, Tilburn J, Diez E, Bignell E, Orejas M, Widdick DA, Sarkar S, Brown CV, Caddick MX, Espeso EA, Arst HN, Peñalva MA (1999) Specificity determinants of proteolytic processing of *Aspergillus* PacC transcription factor are remote from the processing site, and processing occurs in yeast if pH signalling is bypassed. *Mol Cell Biol* **19**: 1390-1400
- Mira NP, Lourenço AB, Fernandes AR, Becker JD, Sá-Correia I (2009) The *RIM101* pathway has a role in *Saccharomyces cerevisiae* adaptive response and resistance to propionic acid and other weak acids. *FEMS Yeast Res* **9**: 202-216
- Mitchell AP (1994) Control of meiotic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **58**: 56-70
- Morris R, O'Connor T, Wyrick J (2010) Ceres: software for the integrated analysis of transcription factor binding sites and nucleosome positions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioinformatics* **26**: 168-174
- Mösch HU, Fink GR (1997) Dissection of filamentous growth by transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **145**: 671-684
- Mösch HU, Köhler T, Braus GH (2001) Different domains of the essential GTPase Cdc42p required for growth and development of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **21**: 235-248
- Mösch HU, Kubler E, Krappmann S, Fink GR, Braus GH (1999) Crosstalk between the Ras2p-controlled mitogen-activated protein kinase and cAMP pathways during invasive growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **10**: 1325-1335
- Mösch HU, Roberts RL, Fink GR (1996) Ras2 signals via the Cdc42/Ste20/mitogen-activated protein kinase module to induce filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 5352-5356
- Mrak EM, Phaff HJ (1948) Yeasts. *Annu Rev Microbiol* **2** (1 vol.): 1-46
- Munn AL, Riezman H (1994) Endocytosis is required for the growth of vacuolar H(+)-ATPase-defective yeast: identification of six new END genes. *J Cell Biol* **127**: 373-386
- Murad AM, Leng P, Straffon M, Wishart J, Macaskill S, MacCallum D, Schnell N, Talibi D, Marechal D, Tekaia F, d'Enfert C, Gaillardin C, Odds FC, Brown AJ (2001) *NRG1* represses yeast-hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*. *EMBO J* **20**: 4742-4752
- Myers LC, Kornberg RD (2000) Mediator of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem* **69**: 729-749

- Naglik J, Fostira F, Ruprai J, Staab J, Challacombe S, Sundstrom P (2006) *Candida albicans* *HWP1* gene expression and host antibody responses in colonization and disease. *J Med Microbiol* **55**: 1323-1327
- Nakamura T, Liu Y, Hirata D, Namba H, Harada S, Hirokawa T, Miyakawa T (1993) Protein phosphatase type 2B (calcineurin)-mediated, FK506-sensitive regulation of intracellular ions in yeast is an important determinant for adaptation to high salt stress conditions. *EMBO J* **12**: 4063-4071
- Narasimhan ML, Coca MA, Jin J, Yamauchi T, Ito Y, Kadowaki T, Kim KK, Pardo JM, Damsz B, Hasegawa PM, Yun DJ, Bressan RA (2005) Osmotin is a homolog of mammalian adiponectin and controls apoptosis in yeast through a homolog of mammalian adiponectin receptor. *Mol Cell* **17**: 171-180
- Natarajan K, Meyer MR, Jackson BM, Slade D, Roberts C, Hinnebusch AG, Marton MJ (2001) Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol Cell Biol* **21**: 4347-4368
- Nelson H, Nelson N (1990) Disruption of genes encoding subunits of yeast vacuolar H(+)-ATPase causes conditional lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 3503-3507
- Niedenthal R, Stoll R, Hegemann JH (1991) In vivo characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* centromere DNA element I, a binding site for the helix-loop-helix protein CPF1. *Mol Cell Biol* **11**: 3545-3553
- Niederberger P, Miozzari G, Hutter R (1981) Biological role of the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **1**: 584-593
- Nobile C, Mitchell A (2006) Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cell Microbiol* **8**: 1382-1391
- Nobile CJ, Solis N, Myers CL, Fay AJ, Deneault JS, Nantel A, Mitchell AP, Filler SG (2008) *Candida albicans* transcription factor Rim101 mediates pathogenic interactions through cell wall functions. *Cell Microbiol* **10**: 2180-2196
- Odds FC (1988) *Candida* and candidosis. 2nd edn Bailliere Tindall, London
- Oh SH, Cheng G, Nuessen JA, Jajko R, Yeater KM, Zhao X, Pujol C, Soll DR, Hoyer LL (2005) Functional specificity of *Candida albicans* Als3p proteins and clade specificity of *ALS3* alleles discriminated by the number of copies of the tandem repeat sequence in the central domain. *Microbiology* **151**: 673-681
- Olesen J, Hahn S, Guarente L (1987) Yeast *HAP2* and *HAP3* activators both bind to the *CYC1* upstream activation site, UAS2, in an interdependent manner. *Cell* **51**: 953-961
- Orejas M, Espeso EA, Tilburn J, Sarkar S, Arst HN, Jr., Peñalva MA (1995) Activation of the *Aspergillus* PacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxy-terminal moiety. *Genes Dev* **9**: 1622-1632

- Orij R, Postmus J, Ter Beek A, Brul S, Smits GJ (2009) In vivo measurement of cytosolic and mitochondrial pH using a pH-sensitive GFP derivative in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a relation between intracellular pH and growth. *Microbiology* **155**: 268-278
- Osumi M (1998) The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron* **29**: 207-233
- Overkamp KM, Kotter P, van der Hoek R, Schoondermark-Stolk S, Luttik MA, van Dijken JP, Pronk JT (2002) Functional analysis of structural genes for NAD(+)-dependent formate dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **19**: 509-520
- Palecek SP, Parikh AS, Kron SJ (2000) Genetic analysis reveals that *FLO11* upregulation and cell polarization independently regulate invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **156**: 1005-1023
- Pan X, Heitman J (1999) Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**: 4874-4887
- Pan X, Heitman J (2000) Sok2 regulates yeast pseudohyphal differentiation via a transcription factor cascade that regulates cell-cell adhesion. *Mol Cell Biol* **20**: 8364-8372
- Pan X, Heitman J (2002) Protein kinase A operates a molecular switch that governs yeast pseudohyphal differentiation. *Mol Cell Biol* **22**: 3981-3993
- Park S, Koh S, Chun J, Hwang H, Kang H (1999) Nrg1 is a transcriptional repressor for glucose repression of *STA1* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**: 2044-2050
- Parle JN (1957) Yeasts isolated from the mammalian alimentary tract. *J Gen Microbiol* **17**: 363-367
- Peñalva M, Arst H (2004) Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts. *Annu Rev Microbiol* **58**: 425-451
- Peñalva MA, Arst HN (2002) Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**
- Peñalva MA, Tilburn J, Bignell E, Arst HN (2008) Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. *Trends Microbiol* **16**: 291-300
- Peñas MM, Hervás-Aguilar A, Múnera-Huertas T, Reoyo E, Peñalva MA, Arst HN, Tilburn J (2007) Further characterization of the signaling proteolysis step in the *Aspergillus nidulans* pH signal transduction pathway. *Eukaryot Cell* **6**: 960-970
- Pfaller MA, Diekema DJ (2007) Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* **20**: 133-163
- Pfaller MA, Jones RN, Messer SA, Edmond MB, Wenzel RP (1998) National surveillance of nosocomial blood stream infection due to *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program. *Diagn Microbiol Infect Dis* **31**: 327-332

- Phaff HJ (1986) Ecology of yeasts with actual and potential value in biotechnology *Microbial Ecology - Springer Verlag* **12**: 31-42
- Phaff HJ (2001) Yeasts. *Encyclopedia of Life Sciences - John Wiley & Sons*
- Pinkham JL, Guarente L (1985) Cloning and molecular analysis of the *HAP2* locus: a global regulator of respiratory genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **5**: 3410-3416
- Pinkham JL, Olesen JT, Guarente LP (1987) Sequence and nuclear localization of the *Saccharomyces cerevisiae HAP2* protein, a transcriptional activator. *Mol Cell Biol* **7**: 578-585
- Pittet M, Conzelmann A (2007) Biosynthesis and function of GPI proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1771**: 405-420
- Plataru M, Ruiz A, Serrano R, Palomino A, Moreno F, Ariño J (2006) The transcriptional response of the yeast Na(+)-ATPase *ENA1* gene to alkaline stress involves three main signaling pathways. *J Biol Chem* **281**: 36632-36642
- Pringle JR, Hartwell LH (1981) The *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. In Broach JR, Strathern J, Jones E (ed), *Molecular biology of the yeast Saccharomyces cerevisiae: life cycle and inheritance Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY*: 97-142
- Proudfoot NJ, Furger A, Dye MJ (2002) Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* **108**: 501-512
- Prusky D, Yakoby N (2003) Pathogenic fungi: leading or led by ambient pH? *Mol Plant Pathol* **4**: 509-516
- Rauceo JM, De Armond R, Otoo H, Kahn PC, Klotz SA, Gaur NK, Lipke PN (2006) Threonine-rich repeats increase fibronectin binding in the *Candida albicans* adhesin Als5p. *Eukaryot Cell* **5**: 1664-1673
- Regenberg B, During-Olsen L, Kielland-Brandt MC, Holmberg S (1999) Substrate specificity and gene expression of the amino-acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **36**: 317-328
- Reich M, Liefeld T, Gould J, Lerner J, Tamayo P, Mesirov J (2006) GenePattern 2.0. *Nat Genet* **38**: 500-501
- Reynolds T, Jansen A, Peng X, Fink G (2008) Mat formation in *Saccharomyces cerevisiae* requires nutrient and pH gradients. *Eukaryot Cell* **7**: 122-130
- Reynolds TB, Fink GR (2001) Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science* **291**: 878-881
- Riezman H, Hase T, van Loon AP, Grivell LA, Suda K, Schatz G (1983) Import of proteins into mitochondria: a 70 kilodalton outer membrane protein with a large carboxy-terminal deletion is still transported to the outer membrane. *EMBO J* **2**: 2161-2168

- Rigden D (2004) The PA14 domain, a conserved all-beta domain in bacterial toxins, enzymes, adhesins and signaling molecules. *Trends Biochem Sci* **29**: 335-339
- Roberts RL, Fink GR (1994) Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes Dev* **8**: 2974-2985
- Roberts RL, Mösch HU, Fink GR (1997) 14-3-3 proteins are essential for RAS/MAPK cascade signaling during pseudohyphal development in *S. cerevisiae*. *Cell* **89**: 1055-1065
- Robertson LS, Causton HC, Young RA, Fink GR (2000) The yeast A kinases differentially regulate iron uptake and respiratory function. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 5984-5988
- Robertson LS, Fink GR (1998) The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 13783-13787
- Rolland F, De Winde JH, Lemaire K, Boles E, Thevelein JM, Winderickx J (2000) Glucose-induced cAMP signalling in yeast requires both a G-protein coupled receptor system for extracellular glucose detection and a separable hexose kinase-dependent sensing process. *Mol Microbiol* **38**: 348-358
- Rolland F, Wanke V, Cauwenberg L, Ma P, Boles E, Vanoni M, de Winde JH, Thevelein JM, Winderickx J (2001) The role of hexose transport and phosphorylation in cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **1**: 33-45
- Rose M, Botstein D (1983) Construction and use of gene fusions to lacZ (beta-galactosidase) that are expressed in yeast. *Methods Enzymol* **101**: 167-180
- Rothfels K, Tanny J, Molnar E, Friesen H, Comisso C, Segall J (2005) Components of the ESCRT pathway, *DFG16*, and *YGR122w* are required for Rim101 to act as a corepressor with Nrg1 at the negative regulatory element of the *DIT1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **25**: 6772-6788
- Ruepp A, Zollner A, Maier D, Albermann K, Hani J, Mokrejs M, Tetko I, Güldener U, Mannhaupt G, Münsterkötter M, Mewes HW (2004) The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. *Nucleic Acids Res* **32**: 5539-5545
- Ruiz A, Ariño J (2007) Function and regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* *ENA* sodium ATPase system. *Eukaryot Cell* **6**: 2175-2183
- Rupp S, Summers E, Lo HJ, Madhani H, Fink G (1999) MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast *FLO11* gene. *EMBO J* **18**: 1257-1269
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology* **24**: 104-108

- Santangelo G (2006) Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 253-282
- Sato M, Maeba H, Watari J, Takashio M (2002) Analysis of an inactivated Lg-*FLO1* gene present in bottom-fermenting yeast. *J Biosci Bioeng* **93**: 395-398
- Schäfer M (2009) Regulation des Oberflächenflokkingens *FLO11* von *Saccharomyces cerevisiae* durch Transkriptionsfaktoren des Rim101-Signalwegs. *Diplomarbeit*
- Schmitt AP, McEntee K (1996) Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 5777-5782
- Serrano R, Martin H, Casamayor A, Ariño J (2006) Signaling alkaline pH stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* through the Wsc1 cell surface sensor and the Slt2 MAPK pathway. *J Biol Chem* **281**: 39785-39795
- Serrano R, Ruiz A, Bernal D, Chambers JR, Ariño J (2002) The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for calcium-mediated signalling. *Mol Microbiol* **46**: 1319-1333
- Sheff M, Thorn K (2004) Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **21**: 661-670
- Shen ZM, Wang L, Pike J, Jue CK, Zhao H, de Nobel H, Kurjan J, Lipke PN (2001) Delineation of functional regions within the subunits of the *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion molecule a-agglutinin. *J Biol Chem* **276**: 15768-15775
- Shenhar G, Kassir Y (2001) A positive regulator of mitosis, Sok2, functions as a negative regulator of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **21**: 1603-1612
- Sheppard DC, Yeaman MR, Welch WH, Phan QT, Fu Y, Ibrahim AS, Filler SG, Zhang M, Waring AJ, Edwards JEJ (2004) Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*. *J Biol Chem* **279**: 30480-30489
- Sherman F, Fink GR, Hicks J (1986) Methods in yeast genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*
- Shore P, Sharrocks A (1995) The MADS-box family of transcription factors. *Eur J Biochem* **229**: 1-13
- Sidorova J, Breeden L (1999) The *MSN1* and *NHP6A* genes suppress *SWI6* defects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **151**: 45-55
- Sieiro C, Reboredo NM, Villa TG (1995) Flocculation of industrial and laboratory strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Ind Microbiol* **14**: 461-466
- Sikorski RS, Hieter P (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**: 19-27



- Smukalla S, Caldara M, Pochet N, Beauvais A, Guadagnini S, Yan C, Vincens MD, Jansen A, Prevost MC, Latge JP, Fink GR, Foster KR, Verstrepen KJ (2008) *FLO1* is a variable green beard gene that drives biofilm-like cooperation in budding yeast. *Cell* **135**: 726-737
- Sorger PK, Pelham HR (1987) Purification and characterization of a heat-shock element binding protein from yeast. *EMBO J* **6**: 3035-3041
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517
- Spellman PT, Sherlock G, Zhang MQ, Iyer VR, Anders K, Eisen MB, Brown PO, Botstein D, Futcher B (1998) Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol Biol Cell* **9**: 3273-3297
- Spicer AP, Rowse GJ, Lidner TK, Gendler SJ (1995) Delayed mammary tumor progression in Muc-1 null mice. *J Biol Chem* **270**: 30093-30101
- Staab J, Bahn Y-S, Tai C-H, Cook P, Sundstrom P (2004) Expression of transglutaminase substrate activity on *Candida albicans* germ tubes through a coiled, disulfide-bonded N-terminal domain of Hwp1 requires C-terminal glycosylphosphatidylinositol modification. *J Biol Chem* **279**: 40737-40747
- Staab JF, Bradway SD, Fidel PL, Sundstrom P (1999) Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science* **283**: 1535-1538
- Stathopoulos AM, Cyert MS (1997) Calcineurin acts through the *CRZ1/TCN1*-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes Dev* **11**: 3432-3444
- Steinbrecher E, Sohr D, Nassauer A, Daschner F, Rüden H, Gastmeier P (2000) Die häufigsten Erreger bei Intensivpatienten mit nosokomialen Infektionen. *Chemotherapie Journal* **5**: 179-183
- Stratford M (1989) Evidence for two mechanisms of flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast Spec No*: 441-445
- Stratford M (1992) Lectin-mediated aggregation of yeasts-yeast flocculation. *Biotechnol Genet Eng Rev* **10**: 283-341
- Stratford M, Assinder S (1991) Yeast flocculation: Flo1 and NewFlo phenotypes and receptor structure. *Yeast* **7**: 559-574
- Su SS, Mitchell AP (1993a) Identification of functionally related genes that stimulate early meiotic gene expression in yeast. *Genetics* **133**: 67-77
- Su SS, Mitchell AP (1993b) Molecular characterization of the yeast meiotic regulatory gene *RIM1*. *Nucleic Acids Res* **21**: 3789-3797
- Sun K, Coic E, Zhou Z, Durrens P, Haber JE (2002) *Saccharomyces* forkhead protein Fkh1 regulates donor preference during mating-type switching through the recombination enhancer. *Genes Dev* **16**: 2085-2096

- Sundstrom P (2002) Adhesion in *Candida* spp. *Cell Microbiol* **4**: 461-469
- Surana U, Robitsch H, Price C, Schuster T, Fitch I, Fitcher AB, Nasmyth K (1991) The role of *CDC28* and cyclins during mitosis in the budding yeast *S. cerevisiae*. *Cell* **65**: 145-161
- Tenney KA, Glover CV (1999) Transcriptional regulation of the *S. cerevisiae ENA1* gene by casein kinase II. *Mol Cell Biochem* **191**: 161-167
- Tesfaigzi J, Smith-Harrison W, Carlson DM (1994) A simple method for reusing western blots on PVDF membranes. *BioTechniques* **17**: 268-269
- Teunissen AW, Holub E, van der Hucht J, van den Berg JA, Steensma HY (1993) Sequence of the open reading frame of the *FLO1* gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **9**: 423-427
- Teunissen AW, Steensma HY (1995) Review: the dominant flocculation genes of *Saccharomyces cerevisiae* constitute a new subtelomeric gene family. *Yeast* **11**: 1001-1013
- Teunissen AW, van den Berg JA, Steensma HY (1995) Localization of the dominant flocculation genes *FLO5* and *FLO8* of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **11**: 735-745
- Thevelein JM, Bonini BM, Castermans D, Haesendonckx S, Kriel J, Louwet W, Thayumanavan P, Popova Y, Rubio-Teixeira M, Schepers W, Vandormael P, Van Zeebroeck G, Verhaert P, Versele M, Voordeckers K (2008) Novel mechanisms in nutrient activation of the yeast protein kinase A pathway. *Acta Microbiol Immunol Hung* **55**: 75-89
- Thevelein JM, Cauwenberg L, Colombo S, De Winde JH, Donation M, Dumortier F, Kraakman L, Lemaire K, Ma P, Nauwelaers D, Rolland F, Teunissen A, Van Dijck P, Versele M, Wera S, Winderickx J (2000) Nutrient-induced signal transduction through the protein kinase A pathway and its role in the control of metabolism, stress resistance, and growth in yeast. *Enzyme Microb Technol* **26**: 819-825
- Toda T, Cameron S, Sass P, Zoller M, Scott JD, McMullen B, Hurwitz M, Krebs EG, Wigler M (1987a) Cloning and characterization of *BCY1*, a locus encoding a regulatory subunit of the cyclic AMP-dependent protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **7**: 1371-1377
- Toda T, Cameron S, Sass P, Zoller M, Wigler M (1987b) Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell* **50**: 277-287
- Toda T, Uno I, Ishikawa T, Powers S, Kataoka T, Broek D, Cameron S, Broach J, Matsumoto K, Wigler M (1985) In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase. *Cell* **40**: 27-36
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 4350-4354
- Treitel MA, Carlson M (1995) Repression by *SSN6-TUP1* is directed by *MIG1*, a repressor/activator protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 3132-3136

- Tréton B, Blanchin-Roland S, Lambert M, Lépingle A, Gaillardin C (2000) Ambient pH signalling in ascomycetous yeasts involves homologues of the *Aspergillus nidulans* genes palF and palH. *Mol Gen Genet* **263**: 505-513
- Udenfriend S, Kodukula K (1995) How glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. *Annu Rev Biochem* **64**: 563-591
- van Dyk D, Hansson G, Pretorius IS, Bauer FF (2003) Cellular differentiation in response to nutrient availability: The repressor of meiosis, Rme1p, positively regulates invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **165**: 1045-1058
- van Dyk D, Pretorius IS, Bauer FF (2005) Mss11p is a central element of the regulatory network that controls *FLO11* expression and invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **169**: 91-106
- Van Mulders S, Christianen E, Saerens S, Daenen L, Verbelen P, Willaert R, Verstrepen K, Delvaux F (2009) Phenotypic diversity of Flo protein family-mediated adhesion in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **9**: 178-190
- Verstrepen K, Klis F (2006) Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol Microbiol* **60**: 5-15
- Verstrepen KJ, Derdelinckx G, Verachtert H, Delvaux FR (2003) Yeast flocculation: what brewers should know. *Appl Microbiol Biotechnol* **61**: 197-205
- Verstrepen KJ, Reynolds TB, Fink GR (2004) Origins of variation in the fungal cell surface. *Nat Rev Microbiol* **2**: 533-540
- Viladevall L, Serrano R, Ruiz A, Domenech G, Giraldo J, Barceló A, Ariño J (2004) Characterization of the calcium-mediated response to alkaline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **279**: 43614-43624
- Villar CC, Kashleva H, Nobile CJ, Mitchell AP, Dongari-Bagtzoglou A (2007) Mucosal tissue invasion by *Candida albicans* is associated with E-cadherin degradation, mediated by transcription factor Rim101p and protease Sap5p. *Infect Immun* **75**: 2126-2135
- Vincent O, Townley R, Kuchin S, Carlson M (2001) Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific beta subunits and a novel glucose signaling mechanism. *Genes Dev* **15**: 1104-1114
- Volschenk H, Viljoen M, Grobler J, Petzold B, Bauer F, Subden R, Young R, Lonvaud A, Denayrolles M, van Vuuren H (1997) Engineering pathways for malate degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol* **15**: 253-257
- Vyas VK, Berkey CD, Miyao T, Carlson M (2005) Repressors Nrg1 and Nrg2 regulate a set of stress-responsive genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **4**: 1882-1891
- Vyas VK, Kuchin S, Carlson M (2001) Interaction of the repressors Nrg1 and Nrg2 with the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **158**: 563-572

- Ward MP, Gimeno CJ, Fink GR, Garrett S (1995) *SOK2* may regulate cyclic AMP-dependent protein kinase-stimulated growth and pseudohyphal development by repressing transcription. *Mol Cell Biol* **15**: 6854-6863
- Watari J, Takata Y, Ogawa M, Sahara H, Koshino S, Onnela ML, Airaksinen U, Jaatinen R, Penttilä M, Keranen S (1994) Molecular cloning and analysis of the yeast flocculation gene *FLO1*. *Yeast* **10**: 211-225
- Weigel D, Jurgens G, Kuttner F, Seifert E, Jackle H (1989) The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the *Drosophila* embryo. *Cell* **57**: 645-658
- Werner-Washburne M, Braun E, Johnston GC, Singer RA (1993) Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **57**: 383-401
- Wieland J, Nitsche AM, Strayle J, Steiner H, Rudolph HK (1995) The *PMR2* gene cluster encodes functionally distinct isoforms of a putative Na<sup>+</sup> pump in the yeast plasma membrane. *EMBO J* **14**: 3870-3882
- Wilson W (1996) Glucose repression/derepression in budding yeast: *SNF1* protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP:ATP ratio. *Curr Biol* **6**: 1426-1434
- Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent S, Seifert H, Wenzel R, Edmond M (2004) Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* **39**: 309-317
- Wojciechowicz D, Lu CF, Kurjan J, Lipke PN (1993) Cell surface anchorage and ligand-binding domains of the *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion protein alpha-agglutinin, a member of the immunoglobulin superfamily. *Mol Cell Biol* **13**: 2554-2563
- Wolfsberg TG, Gabrielian AE, Campbell MJ, Cho RJ, Spouge JL, Landsman D (1999) Candidate regulatory sequence elements for cell cycle-dependent transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Res* **9**: 775-792
- Xie Y, Varshavsky A (2001) RPN4 is a ligand, substrate, and transcriptional regulator of the 26S proteasome: a negative feedback circuit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 3056-3061
- Xing Y, Fikes JD, Guarente L (1993) Mutations in yeast *HAP2/HAP3* define a hybrid CCAAT box binding domain. *EMBO J* **12**: 4647-4655
- Xu W, Mitchell AP (2001) Yeast PalA/AIP1/Alix homolog Rim20p associates with a PEST-like region and is required for its proteolytic cleavage. *J Bacteriol* **183**: 6917-6923
- Xu W, Smith FJ, Subaran R, Mitchell AP (2004) Multivesicular body-ESCRT components function in pH response regulation in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Molecular Biology of the Cell* **15**: 5528-5537
- Yoneyama M (1957) Studies on natural habitats of yeasts - bark-inhabiting yeasts. *Journal of Science of the Hiroshima University, Series B, Div 2 (Botany)* **8**: 19-38

- Yoshimoto H, Saltsman K, Gasch AP, Li HX, Ogawa N, Botstein D, Brown PO, Cyert MS (2002) Genome-wide analysis of gene expression regulated by the calcineurin/Crz1p signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **277**: 31079-31088
- Zara S, Bakalinsky A, Zara G, Pirino G, Demontis MA, Budroni M (2005) *FLO11*-based model for air-liquid interfacial biofilm formation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **71**: 2934-2939
- Zhang M, Bennett D, Erdman SE (2002) Maintenance of mating cell integrity requires the adhesin Fig2p. *Eukaryot Cell* **1**: 811-822
- Zhao H, Shen ZM, Kahn PC, Lipke PN (2001) Interaction of alpha-agglutinin and a-agglutinin, *Saccharomyces cerevisiae* sexual cell adhesion molecules. *J Bacteriol* **183**: 2874-2880
- Zhao X, Daniels K, Oh S-H, Green C, Yeater K, Soll D, Hoyer L (2006) *Candida albicans* Als3p is required for wild-type biofilm formation on silicone elastomer surfaces. *Microbiology* **152**: 2287-2299
- Zhou H, Winston F (2001) *NRG1* is required for glucose repression of the *SUC2* and *GAL* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genet* **2**
- Zhu C, Byers K, McCord RP, Shi Z, Berger M, Newburger D, Saulrieta K, Smith Z, Shah M, Radhakrishnan M, Philippakis A, Hu Y, De Masi F, Pacek M, Rolfs A, Murthy T, Labaer J, Bulyk M (2009) High-resolution DNA-binding specificity analysis of yeast transcription factors. *Genome Res* **19**: 556-566
- Zhu G, Spellman PT, Volpe T, Brown PO, Botstein D, Davis TN, Futcher B (2000) Two yeast forkhead genes regulate the cell cycle and pseudohyphal growth. *Nature* **406**: 90-94
- Zupancic ML, Frieman M, Smith D, Alvarez RA, Cummings RD, Cormack BP (2008) Glycan microarray analysis of *Candida glabrata* adhesin ligand specificity. *Mol Microbiol* **68**: 547-559

## **Lebenslauf**

*Die Seite 204 (Lebenslauf) enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.*

## **Danksagung**

Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch danke ich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seinem Labor anzufertigen. Besonders möchte ich ihm für seine Diskussionsbereitschaft und sein Interesse am Fortgang der Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. Michael Bölker danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und die hilfreichen Anregungen während meiner „GRK 1216 thesis committee“-Sitzungen.

Auch bei Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl bedanke ich mich für die hilfreichen Ideen während meiner „thesis committee“-Sitzungen und ebenso wie Herrn Prof. Dr. Alfred Batschauer für die Bereitschaft, der Prüfungskommission anzugehören.

Der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. G. Kost (Mykologie), im Besonderen Herrn Dr. K.-H. Rexer, danke ich für die Zusammenarbeit bei der SEM, Herrn Dr. P. Yu (Immunologie, BMFZ) danke ich für die Zusammenarbeit bei den FACS-Analysen und der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. R. Kahmann (MPI für terrestrische Mikrobiologie, Organismische Interaktionen), im Besonderen Herrn Prof. Dr. J. Kämper (jetzt KIT Institut für Angewandte Biowissenschaften Karlsruhe, Genetik) für die Zusammenarbeit bei den Transkriptomanalysen.

Dem Graduiertenkolleg 1216 der DFG gilt der Dank für die Unterstützung meiner Arbeit und für die Plattform zum wissenschaftlichen Austausch, die es mir bot.

Ein besonderer Dank gebührt allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Mösch. Dies sind Hannelore Steinebach, Marc Jungbluth, Markus Schäfer, Mario Malcher, Christof Taxis, Christian Renicke, Daniela Störmer, Sarah Schladebeck, Julia van der Felden, Sarah Weisser, Diana Kruhl, Rike Diderrich, Sandra Kern, Stefan Brückner, Sandra Benthin, Peter Mark, Sarah Hofmann, Barbara Heise, Vera Duwe und Daniel Schuster (ich hoffe, ich habe niemanden vergessen) für die nette Arbeitsatmosphäre.

An Marc, Markus, Christof, Christian, Nina, Daniela und Peter geht ein besonderer Gruß für die super Atmosphäre und vielen ideenreichen Diskussionen im Labor. Markus und Peter danke ich für ihre tolle Mitarbeit am pH-Projekt als Diplomanden, die stets unterhaltsam und produktiv war. Bei Hanne möchte ich mich für die Hilfe bei all

den administrativen Situationen des "realen" Lebens bedanken, ohne die vieles nicht möglich gewesen wäre. Diana und Daniela danke ich für die Organisation des Laboralltags.

Meike möchte ich herzlich für das Korrekturlesen des Manuskriptes dieser Arbeit danken, Johannes für die „quick-response“ aus den USA.

Meinen langjährigen Freunden Jörn & Judith, Martin und Sebastian danke ich für ihre Freundschaft und Abwechslung außerhalb des Labors.

Meinen Eltern danke ich für die finanzielle Unterstützung, die das Studium und diese Promotion erst ermöglicht hat. Tausend Dank auch für die ideelle Unterstützung meiner Familie, die die Promotion nun zu einem Ende gebracht hat.

Bei allen Mitgliedern der AG Bölker möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und die lustigen Zeiten in der Kaffeeküche bedanken, insbesondere Kay und Johannes für den Austausch vieler Ideen und die ergiebigen Diskussionen und Annette für die gegenseitige Motivation beim Schreiben dieser Arbeit. Britta und Michaela danke ich für ihre stets fröhliche Art und die Versorgung mit vielen kulinarischen Köstlichkeiten.